

**EPIDEMIOLOGÍA DE LA RESISTENCIA A METICILINA
EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS EN
HOSPITALES ESPAÑOLES.**



***Autora:* Carmen Borraz Ordás.**

***Tutora:* M^a Angeles Domínguez Luzón.**

***Programa de doctorado:* MICROBIOLOGIA MÈDICA.**

***Bienio:* 2003-2005.**

***Departamento:* PATOLOGIA I TERAPÈUTICA EXPERIMENTAL.**

Facultad de medicina.

Universidad de Barcelona.

Abreviaturas.....	1
I.- INTRODUCCIÓN.	3
1. <i>S. aureus</i> : características microbiológicas y patogenia.	
1.1. Características microbiológicas.	
1.2. Epidemiología.	
1.3. Patogenia.	
1.4. Cuadros clínicos.	
1.5. Características genéticas de <i>S. aureus</i> .	
2. Resistencia antibiótica en <i>S. aureus</i> .	
2.1. Generalidades. Principales grupos de antibióticos con actividad frente a <i>S. aureus</i> .	
2.2. Evolución de la resistencia antibiótica en <i>S. aureus</i> .	
2.3. Resistencia a meticilina en <i>S. aureus</i> .	
2.3.1. Generalidades. Penicilinas semisintéticas.	
2.3.2. Mecanismos de resistencia en <i>S. aureus</i> .	
2.3.2.a. Modificación de la diana.	
2.3.2.b. Resistencia a meticilina no mediada por el gen <i>mecA</i> .	
2.4. Resistencia a los antibióticos del grupo macrólidos-lincosamidas-estreptograminas-cetólidos (MLSK).	
2.4.1. Características generales de los antibióticos del grupo MLSK	
2.4.2. Mecanismos de resistencia en <i>S. aureus</i>	
2.5. Resistencia a glucopéptidos.	
2.5.1. Características generales de los glucopéptidos.	
2.5.2. <i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia heterogénea a vancomicina (VISA-heterorresistente) y <i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia intermedia a vancomicina (VISA).	
2.5.3. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina (VRSA).	
2.5.4. Mecanismos de resistencia en <i>S. aureus</i> .	
2.6. Resistencia a mupirocina.	
2.6.1. Características generales de la mupirocina.	
2.6.2. Mecanismos de resistencia en <i>S. aureus</i> .	

3. Historia de la resistencia a meticilina en *S. aureus*.
 - 3.1. Aparición y evolución de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM).
 - 3.2. Descripción de clones epidémicos.
 - 3.3. Datos en España.
4. Epidemiología de las infecciones por SARM en la comunidad.
5. Tipificación molecular de microorganismos.
 - 5.1. Fundamentos y aplicaciones de los sistemas de tipificación molecular en bacteriología.
 - 5.2. Macrorrestricción de DNA y electroforesis en campo pulsante.
 - 5.2.1. Fundamentos y variantes técnicas.
 - 5.2.2. Variables que afectan a la resolución del PFGE.
 - 5.2.3. Criterios para la interpretación de resultados.
 - 5.2.4. Indicaciones e inconvenientes de la técnica.
 - 5.3. Análisis del ADN por secuenciación: *Multilocus Sequence Typing (MLST.)*

II.-	OBJETIVOS.	66
III.-	MATERIALES Y MÉTODOS.	67

1. Diseño del estudio.
2. Identificación bioquímica de los aislamientos recibidos.
3. Estudio de la sensibilidad antibiótica.
4. Confirmación de la resistencia a meticilina.
 - 4.1. Técnica de PCR para detección del gen *mecA*.
 - 4.1.1. Extracción del DNA.
 - 4.1.2. Amplificación del DNA.
 - 4.1.3. Detección e interpretación de resultados.
5. Caracterización genotípica.
 - 5.1. Electroforesis en campo pulsátil.
 - 5.1.1. Extracción del DNA.
 - 5.1.2. Restricción del DNA.

- 5.1.3. Electroforesis de los fragmentos de restricción e interpretación de los resultados.
- 5.2. Multilocus Sequence Typing -MLST-.
 - 5.2.1. Extracción del DNA.
 - 5.2.2. Amplificación de los genes metabólicos.
 - 5.2.3. Secuenciación de los genes metabólicos.
 - 5.2.4. Análisis de secuencias.
- 5.3. Análisis del polimorfismo asociado al *cassette* cromosómico estafilocócico que contiene al gen *mecA* (*Staphylococcal cassette chromosome mec*, SCCmec).
 - 5.1.1. Extracción del DNA.
 - 5.1.2. Amplificación del DNA.
 - 5.1.3. Detección e interpretación de resultados.
- 6. Estudio de los genes de resistencia a macrólidos.
 - 6.1. Técnica de PCR para detección de genes *ermA*, *ermB*, *ermC* y *msrA*.
 - 6.1.1. Extracción del DNA.
 - 6.1.2. Amplificación del DNA.
 - 6.1.3. Detección e interpretación de resultados.
- 7. Detección de la Leucocidina de Panton-Valentine de cepas SARM-CO.
 - 7.1. Extracción del DNA.
 - 7.2. Amplificación del DNA.
 - 7.3. Detección e interpretación de resultados.

IV.- RESULTADOS. 97

- 1. Resistencia a meticilina de las cepas aisladas en hospitales españoles en el mes de junio de 2003.
 - 1.1. Participación de hospitales en el estudio.
 - 1.2. Cepas incluidas en el estudio. Porcentaje de resistencia a meticilina.
- 2. Sensibilidad antibiótica y patrones de resistencia a antibióticos no beta-lactámicos.
 - 2.1. Porcentaje de resistencia antibiótica.

- 2.2. Caracterización del patrón de resistencia antibiótica en las cepas SARM.
 - 2.1.1. Patrones de resistencia antibiótica.
 - 2.1.2. Estudio de los patrones de resistencia en relación con los hospitales.
 - 2.1.3. Distribución geográfica.
3. Caracterización genotípica de las cepas SARM estudiadas mediante electroforesis en campo pulsátil, MLST y SCCmec.
 - 3.1. Caracterización genotípica mediante electroforesis en campo pulsátil.
 - 3.1.1. Relación entre genotipos y patrones de resistencia antibiótica.
 - 3.1.2. Estudio de los patrones genotípicos en relación con los hospitales.
 - 3.2. Caracterización genotípica mediante *Multilocus Sequence typing* (MLST).
 - 3.3. Caracterización genotípica mediante SCCmec.
4. Mecanismos de resistencia a macrólidos, lincosaminas y estreptogramina B. Distribución de los genes de resistencia correspondientes.
 - 4.1. Distribución clonal de los genes de resistencia a macrólidos.
5. Estudio de la producción de Leucocidina de Panton Valentine.

V.- DISCUSIÓN. 141

1. Porcentaje de resistencia a meticilina en *S. aureus* aisladas en diferentes hospitales españoles durante el mes de junio de 2003.
2. Estudio de la sensibilidad y los patrones de resistencia antibiótica de las cepas SARM obtenidas en el estudio.
3. Caracterización genotípica de las cepas SARM.
 - 3.1. *Electroforesis en campo pulsátil* -ECP-.
 - 3.2. *Multilocus sequence typing* -MLST-.
 - 3.3. *Staphylococcal cassette chromosome mec* -SCCmec-.
4. Estudio de los genes de resistencia a macrólidos y su distribución clonal.
5. Estudio de la producción de Leucocidina de Panton-Valentine.

VI.- CONCLUSIONES.	157
VII.- BIBLIOGRAFIA.	159

A:	Adenina
ADVP:	Adictos a drogas por vía parenteral
BHI:	Brain heart infusion
BSA:	Albúmina sérica bovina
C:	Citosina
CDC:	Centers for disease control and prevention
CMI:	Concentración mínima inhibitoria
CLSI:	Clinical and Laboratory Standard Institute (antes NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standars)
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dNTP:	desoxinucleósido 5'-trifosfato
DLV:	Double locus variant
EARSS:	European antimicrobial resistance surveillance system
ECP:	Electroforesis en campo pulsátil
EDTA:	Ácido etilén-diamino-tetraacético
EMRSA:	Epidemic Methicillin Resistant <i>S. aureus</i>
EPINE:	Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales en España
ETA:	Toxina exfoliativa tipo A
ETB:	Toxina exfoliativa tipo B
G:	Guanina
GISA:	<i>S. aureus</i> con resistencia intermedia a glicopéptidos
Ig G:	Inmunoglobulinas de tipo G
Kb:	Kilobases ó mil pares de bases
LPV:	Leucocidina de Pantón-Valentine

MLST:	Tipado mediante secuenciación multilocular (<i>Multilocus sequence typing</i>)
ORF:	Fragmento de lectura abierta (<i>open reading frame</i>)
pb:	Pares de bases
PBP:	Proteína que une la penicilina (penicillin binding protein)
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PIV:	Tampón Tris-HCl + NaCl
PR:	Patrón de resistencia antibiótica
r.p.m.:	Revoluciones por minuto
SARM:	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina
SARM-CO:	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina de adquisición comunitaria
SASM:	<i>S. aureus</i> sensible a meticilina
SCCmec:	Cassette estafilocócico cromosomal del gen <i>mecA</i> (<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i>)
SLV:	Single locus variant
ST:	Secuencia tipo
T:	Tirosina
TBE:	Tampón TRIS + ácido bórico + EDTA
TE:	Tampón TRIS-HCL + EDTA
Tris:	Tris (hidroximetil) aminoetano
TSST-1:	Toxina-1 del síndrome del shock tóxico
UCI:	Unidad de cuidados intensivos
VIRA:	Vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos
VRSA:	<i>S. aureus</i> resistente a vancomicina
6-APA:	Ácido 6-aminopenicilánico

1. *Staphylococcus aureus*: características microbiológicas y patogenia

1.1. Características microbiológicas

Staphylococcus aureus pertenece al género *Staphylococcus* de la familia *Micrococcaceae*. Las especies del género *Staphylococcus* son cocos gram positivos de 0,5 a 1µm de diámetro, inmóviles, aerobios y anaerobios facultativos, no forman esporas y generalmente no están capsulados. El nombre del género fue designado por Ogston en 1883 (Ogston, 1883) y deriva del griego *staphylé* (“en racimo de uvas”), debido a la morfología que adoptan las células de *Staphylococcus* en las tinciones que se realizan a partir de cultivos en medios de agar. En tinciones de muestra directa, los microorganismos también aparecen como células únicas o en parejas o formando tétradas (figura 1.1).

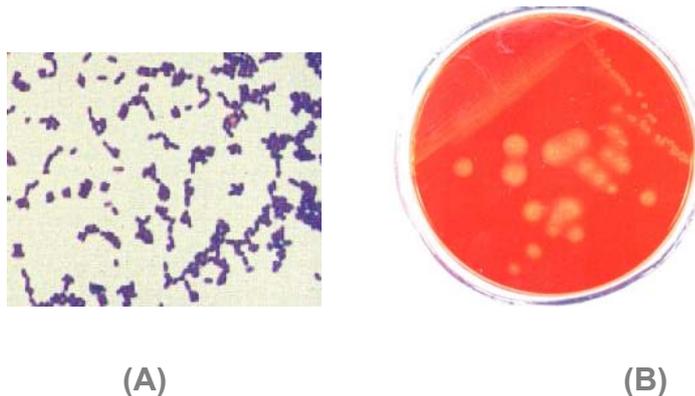


Figura 1.1- (A) Tinción de Gram de un coco Gram-positivo agrupado en racimos.

(B) Crecimiento en placa de agar sangre de colonias doradas de *S. aureus*.

El género *Staphylococcus* se compone de 35 especies y 17 subespecies, entre ellas cabe destacar por su importancia como agentes etiológicos de infecciones en humanos, los siguientes: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleferi*, *S. warneri*, y *S. saprophyticus*.

Staphylococcus aureus es la especie más patógena y virulenta para el hombre, pero también puede encontrarse colonizando la piel y las mucosas. Las colonias de *S. aureus* presentan un color amarillo dorado característico debido a la producción de carotenoides durante su crecimiento, de ahí su

nombre que deriva de la palabra latina con la que se designa el oro (Figura 1.1), sin embargo muchas cepas presentan variantes no pigmentadas. *S. aureus* crece bien a altas concentraciones de NaCl, es coagulasa, DNAsa y catalasa positivo y fermenta el manitol, lo que permite diferenciarlo del resto de de especies del género *Staphylococcus* (Bannerman, 2003).

1.2. Epidemiología

S. aureus es un patógeno oportunista que forma parte de la microflora humana, pudiendo estar colonizada por esta bacteria entre el 30% y el 50% de la población, siendo la localización más frecuente la colonización nasal. El principal reservorio de *S. aureus* lo constituye el hombre enfermo o portador. La frecuencia de colonización es más frecuente en el medio hospitalario, especialmente en pacientes sometidos a hemodiálisis, diabéticos tipo I, pacientes con lesiones cutáneas, sujetos infectados por el VIH y en adictos a drogas por vía parenteral (ADVP).

El portador nasofaríngeo asintomático es también el origen más frecuente de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM). Actualmente este microorganismo es reconocido como uno de los patógenos más importantes causantes de infecciones nosocomiales en todo el mundo. Cuando una persona entra en contacto con una cepa SARM puede resultar colonizada, desarrollar infección y/o convertirse en portador (Wenzel, 1998):

Así pues, se habla de colonización por SARM cuando este microorganismo es aislado en una muestra clínica en ausencia de signos de infección. Las zonas más frecuentes de colonización son, las lesiones cutáneas, el tracto respiratorio y el tracto urinario (Coello, 1994). La colonización por SARM puede persistir durante meses o años (Sanford, 1994).

Las infecciones causadas por SARM son las mismas que las cepas sensibles a meticilina. Las más frecuentes son las de herida quirúrgica (10-28%), bacteriemia (10-21%) generalmente a partir de catéter, y la neumonía (15-40%), sobre todo en enfermos ventilados (Pujol, 1994). En menor frecuencia se encuentran las infecciones de partes blandas, urinarias, intraabdominales, cardiovasculares y osteomielitis (Coello, 1994).

Finalmente se considera que una persona es portadora de SARM cuando este microorganismo se aísla en una localización, en la que no suele

causar infección lo que facilita su persistencia en el organismo. La localización más frecuente es la nariz, donde actúa como reservorio, seguido de la orofaringe y las regiones perianal, inguinal, axilar y rectal (Coello, 1994).

Diferentes estudios describen que los portadores nasales de SARM tienen un mayor riesgo de infección nosocomial por este microorganismo, y que los pacientes infectados con SARM presentan una mayor morbi-mortalidad comparada con los pacientes infectados por cepas sensibles de *S. aureus* (Romero-Vivas, 1995; Pujol, 1996; Cosgrove, 2003). Este hecho es importante a la hora de intentar mantener una prevalencia de SARM baja; lo que ha conllevado a realizar diferentes trabajos sobre la aplicación de mupirocina tópica como tratamiento y/o profilaxis para prevenir la colonización y/o infección de SARM. A este respecto hay controversias entre los diferentes autores y no está claro el papel que juega la mupirocina intranasal como erradicación de portadores nasales de *S. aureus*, aunque su eficacia depende del tipo de pacientes a los que se aplica, siendo más eficaz en pacientes quirúrgicos, con diálisis peritoneal, hemodiálisis, infecciones recurrentes de la piel y es poco efectivo en pacientes no sometidos a cirugía (Fernández, 1995; Kluitmans, 1997; Kalmeijer, 2002; Perl, 2002; Laupland, 2003; Peña, 2004; Wertheim, 2004).

1.3. Patogenia

La patogenia de las infecciones por *S. aureus* se produce al combinarse los factores de virulencia bacteriana con una disminución de las defensas del huésped. En su acción patógena intervienen, los componentes de la pared celular y la producción de enzimas y toxinas favorecedoras de la invasión tisular, además de su capacidad para diseminarse y multiplicarse en los tejidos del huésped.

A) Componentes de la pared celular (Figura 1.2):

- Peptidoglicano: es el componente básico de la pared de *S. aureus*. Le confiere resistencia y tolerancia osmótica. Tiene importantes propiedades biológicas: presenta actividad endotóxica, desencadena la producción de interleucina-1 por los monocitos, estimula la quimiotaxis y agregación de los

leucocitos, activa el complemento e induce la producción de anticuerpos opsonizantes.

- Ácidos teicoicos o polisacáridos A: son polímeros de fosfato específicos de especie, pueden estar unidos covalentemente al peptidoglicano de la pared o ligados a los lípidos de la membrana celular. Su función es mediar en la unión de los estafilococos a las superficies mucosas mediante uniones específicas a la fibronectina. Tienen la capacidad de inducir la producción de anticuerpos.

- Diferentes proteínas se pueden unir a la capa externa del peptidoglicano mediante enlaces covalentes: i) proteínas que facilitan la adhesividad del microorganismo (proteína fijadora de colágeno, proteína fijadora de fibronectina), ii) factor de agregación (clumping factor) ó coagulasa ligada a la célula, se une al fibrinógeno facilitando así la agregación bacteriana, y iii) proteína A, específica de *S. aureus*, activa el complemento y bloquea la fracción Fc de las IgG, por lo que previene la eliminación del microorganismo mediada por anticuerpos inhibiendo la opsonización y la fagocitosis.

- Cápsula externa o glucocálix: es de naturaleza polisacárida, facilita la adherencia de las bacterias y tiene capacidad antifagocitaria. Se han descrito 11 serotipos capsulares, de los cuales los serotipos 5 y 8 son los que se asocian con la mayor parte de las infecciones.

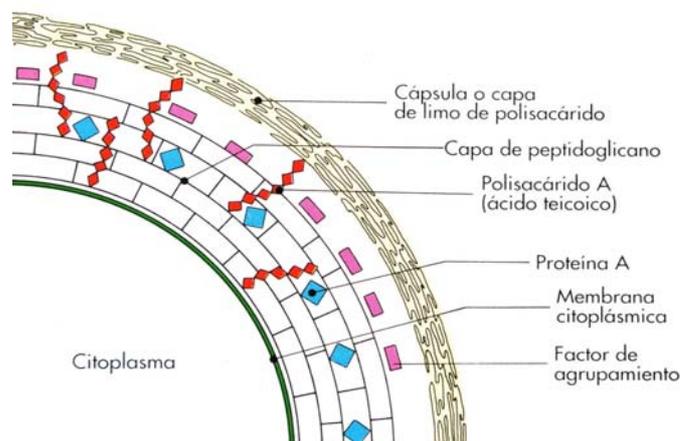


Figura 1.2- Estructura de la pared celular estafilocócica.

B) Enzimas

Son sustancias que producen su acción en zonas próximas al foco infeccioso. Las más importantes son (Bannerman, 2003):

- *Catalasa*: degrada el peróxido de hidrógeno protegiendo al microorganismo durante la fagocitosis.

- *Coagulasa*: se encuentra en dos formas: el factor de agregación o coagulasa ligada, al que nos hemos referido al tratar los componentes de la pared celular, y la coagulasa libre o extracelular. Ambas, intervienen en la formación de coágulos, convierten el fibrinógeno en fibrina, facilitando procesos sépticos y permitiendo la formación de abscesos. Existe una fuerte correlación entre la producción de coagulasa y la virulencia de la cepa. La detección de la coagulasa libre es la prueba que diferencia *S. aureus* de los estafilococos coagulasa negativos.

- *Hialuronidasa*: degrada el ácido hialurónico de la matriz del tejido conjuntivo y facilita la propagación de la infección.

- *Penicilinasa*: producida en la actualidad por casi todas las cepas de *S. aureus*. Es una beta-lactamasa que inactiva la penicilina mediante la hidrólisis de su anillo beta-lactámico.

- Otros enzimas: la mayoría de cepas de *S. aureus* sintetizan además otros enzimas como *lipasas*, *proteasas*, *nucleasas* o enzimas que hidrolizan los ácidos nucleicos y *estafiloquinasas* o sustancias fibrinolíticas.

C) Toxinas

Algunas cepas de *S. aureus* son capaces de sintetizar proteínas extracelulares adicionales que producen su acción en zonas distantes del foco infeccioso. Su expresión está regulada por un gen accesorio regulador de proteínas (*agr*) y pueden ser codificadas por el ADN cromosómico o plasmídico. Las más importantes son (Dinges, 2000):

- *Hemolisinas*: se han identificado cuatro denominadas, *alfa*, *beta*, *gamma* y *delta*. Son sintetizadas por la mayoría de las cepas de *S. aureus*. Poseen capacidad hemolítica y citolítica actuando sobre determinadas células eucariotas del huésped como leucocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos. La *toxina alfa* es la mejor estudiada. Parece intervenir en el desarrollo de edema y daño tisular como consecuencia de los cambios de permeabilidad

inducidos en las células endoteliales y los consiguientes cambios en el balance iónico.

- *Leucocidina de Panton-Valentine*: es sintetizada por el 2-3% de las cepas, está compuesta por dos subunidades proteicas, la F y S, sintetizadas independientemente, que actúan en forma sinérgica sobre las membranas de las células fagocíticas. Se une a los fosfolípidos de la membrana de los leucocitos y macrófagos induciendo la formación de poros que destruyen la célula al alterar la permeabilidad celular.

- *Toxinas exfoliativas o epidermolíticas*: la prevalencia de cepas productoras de estas toxinas varía geográficamente, pero generalmente es inferior al 5-10%. Se han identificado dos serotipos, A y B (ETA y ETB), ambas pueden producir el síndrome de la piel escaldada. La *toxina exfoliativa A* es termoestable y de codificación cromosómica, mientras que la *B* es termolábil y de codificación plasmídica. Actúan destruyendo los desmosomas del estrato granuloso de la epidermis, sin citolisis ni inflamación, por lo que en la capa de la epidermis afectada no se encuentran ni leucocitos ni estafilococos. Poseen actividad proteasa serínica, lo que desencadenaría la exfoliación.

- *Enterotoxinas*: son producidas por el 30-50% de las cepas de *S. aureus*. Se han descrito 8 serotipos de enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C, D, E, G, H, I) siendo el serotipo A el más común de todos ellos. Son termoestables y resistentes a los enzimas digestivos, siendo responsables de intoxicaciones alimentarias con emesis y cuadros de enterocolitis. Poseen las características inmunomoduladoras propias de los superantígenos.

- *Toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1)*: anteriormente denominada exotoxina pirogénica C o enterotoxina F, es una proteína termoestable sintetizada por genes cromosómicos. Actúa como un superantígeno, induciendo la liberación de citocinas por macrófagos y linfocitos T. A bajas concentraciones produce la extravasación de las células endoteliales, y a altas concentraciones tiene efecto citotóxico.

1.4. Cuadros clínicos

La infección por *S. aureus* se produce tras lesiones cutáneas, traumáticas o quirúrgicas que favorecen la penetración del microorganismo desde la piel hasta los tejidos profundos. Desde estos puntos puede producir

bacteriemia y cuadros metastáticos. Las infecciones causadas por *S. aureus* generalmente son supurativas y tienden a la formación de abscesos (Pascual, 2005; Lowy, 2006).

A) Infecciones de piel y partes blandas

Se caracterizan por la formación de vesículas pustulosas que comienzan en los folículos pilosos propagándose a los tejidos vecinos. La *foliculitis* es una infección piogénica superficial del folículo piloso. Su extensión al tejido perifolicular da lugar al *forúnculo*. El *ántrax* es la infección de varios forúnculos con extensión a la capa más profunda del tejido subcutáneo. Puede producir bacteriemia en un tercio de los casos.

Otras infecciones cutáneas por *S. aureus* son *impétigo* (infección superficial que afecta sobre todo a niños en áreas expuestas), *mastitis*, *hidrosadenitis supurada*, *celulitis*, *fascitis* y *paroniquia*.

S. aureus es uno de los patógenos más frecuentes en infecciones de *heridas quirúrgicas*, tanto superficiales como profundas. También puede causar infección de *úlceras crónicas* (úlceras por presión, pie diabético).

B) Bacteriemia y endocarditis

S. aureus es una causa común de *bacteriemia*. El foco inicial de infección se desconoce en un tercio de los casos. Las bacteriemias por *S. aureus* que acontecen en el hospital se relacionan con el uso de catéteres y otros procedimientos invasivos, mientras que en las bacteriemias de la comunidad el foco originario suele ser extravascular (infecciones de piel y más raramente en el aparato respiratorio, neumonías).

Las infecciones metastásicas y la endocarditis son complicaciones importantes de la bacteriemia. La frecuencia de *endocarditis* entre los pacientes con bacteriemia por *S. aureus* varía entre un 5% y un 21%, respectivamente, según sean pacientes con bacteriemia nosocomial o de adquisición comunitaria (Chang, 2003). *S. aureus* es la causa más frecuente de endocarditis infecciosa aguda, afecta sobre todo a las válvulas mitral y aórtica, ya sean nativas o protésicas. La endocarditis aguda derecha de la válvula tricúspide por *S. aureus* suele observarse en los adictos a drogas por vía parenteral, aunque en la actualidad es menos frecuente y tiene un mejor pronóstico. Entre las complicaciones de la endocarditis por *S. aureus* están la insuficiencia cardíaca por destrucción valvular, embolismos sépticos, abscesos hematógenos

cerebrales o viscerales, abscesos miocárdicos y pericarditis purulenta.

C) Pericarditis

La *pericarditis* generalmente es de origen hematógeno, aunque también puede ocurrir tras cirugía, en cuyo caso el pronóstico es grave, o por un traumatismo penetrante.

D) Infecciones músculoesqueléticas

S. aureus es uno de los microorganismos que con mayor frecuencia origina infecciones óseas, por diseminación hematógena y por contigüidad.

En los niños, la *osteomielitis hematógena* suele afectar a las metáfisis de los huesos largos, mientras que en los adultos, *S. aureus* suele afectar al tejido esponjoso vertebral dando lugar a *osteomielitis vertebral*.

La *osteomielitis crónica, por contigüidad*, es más frecuente y se produce como complicación de cirugía ortopédica y traumatismos. También puede ocasionar *infección de prótesis articulares*.

S. aureus es el principal agente etiológico de *artritis séptica* y de *bursitis*. Las articulaciones afectadas con mayor frecuencia son las rodillas, tobillos, caderas, hombros y las interfalángicas.

La *piomiositis* es una infección poco común de los músculos de fibra estriada que afecta a personas con enfermedad de base. La forma más frecuente es el *absceso del psoas*, de origen hematógeno o como consecuencia de una infección vertebral.

E) Infecciones de las vías respiratorias

La *neumonía estafilocócica* es un cuadro infrecuente pero grave, se puede producir por aspiración de secreciones orales o por diseminación hematógena. Esta última se produce generalmente a partir de una endocarditis derecha, de una tromboflebitis séptica o de una infección de cable de marcapasos. La *neumonía por aspiración de adquisición comunitaria* se produce como complicación de cuadros víricos, mientras que la *nosocomial* es más frecuente en pacientes sometidos a ventilación mecánica. La complicación más frecuente de la *neumonía* es el *empiema*.

También es frecuente encontrar *S. aureus* como agente etiológico de *sinusitis* y de *infección bronquial* en pacientes con fibrosis quística.

F) Infecciones del sistema nervioso central

La *meningitis piógena estafilocócica* puede ser de origen hematógeno o como complicación de un absceso.

Los *abscesos cerebrales* pueden ser de origen hematógeno, a partir de una endocarditis, o por contigüidad, a partir de sinusitis, traumatismos o cirugía.

S. aureus también es la causa más frecuente de *empiema subdural* y *absceso epidural medular o intracraneal*.

G) Infecciones de la vías urinarias

La infección de las vías urinarias por *S. aureus* es muy rara. Su presencia en la orina sugiere origen hematógeno. Las infecciones ascendentes son debidas a manipulación instrumental.

H) Cuadros producidos por toxinas estafilocócicas

- *Síndrome de la piel escaldada*: es una dermatitis exfoliativa ampollar que no afecta mucosas, más frecuente en neonatos y niños. Suele aparecer como complicación de un pioderma localizado.

- *Síndrome del shock tóxico*: es un cuadro grave debido a la producción de la toxina *TSS-1*. Inicialmente fue descrito en niños y posteriormente en mujeres jóvenes que usaban tampones. En la actualidad la mayor parte de los casos son secundarios a infecciones estafilocócicas de diversas localizaciones.

- *Toxiinfección alimentaria o gastroenteritis tóxica estafilocócica*: se debe a la ingestión de alimentos contaminados con toxinas y no directamente a los microorganismos. Es un cuadro agudo afebril autolimitado que cursa con vómitos, dolor cólico y diarrea.

1.5. **Características genéticas de *S. aureus***

S. aureus tiene un genoma de un tamaño aproximado de 2800 Kb, que está formado por un único cromosoma circular en el que se encuentran elementos genéticos móviles como son plásmidos, bacteriófagos, transposones y secuencias de inserción (Pattee, 1990). El estudio de estos elementos ha permitido explicar los mecanismos de transferencia genética entre las cepas mediante procesos de conjugación, transducción, transformación y movilización mediante plásmidos conjugativos (Archer, 1991; Skurray, 1997).

Los plásmidos son moléculas extracromosómicas de DNA circular de pequeño tamaño (2-5 kb) que contienen genes que codifican para la

producción de toxinas y/o para la resistencia a antibióticos y metales pesados. Pueden transferirse de una célula a otra mediante el proceso de conjugación.

Los transposones son fragmentos móviles de DNA, generalmente flanqueados por secuencias repetidas, su longitud varía de unos cientos a unos miles de nucleótidos. La transposición tiene lugar a través de dos mecanismos: uno consiste en la escisión del elemento móvil para posteriormente insertarse en el DNA diana, el otro consiste en un mecanismo de retrotransposición, mediante el cual el transposón genera una copia de si mismo que se insertará en el DNA diana. Los enzimas que catalizan los cortes y las uniones de estos elementos son específicos y están codificados en el propio transposón. Los transposones pueden transportar uno o más marcadores de resistencia antibiótica. Se han descrito distintos transposones como Tn551 portador del gen *ermB* de resistencia a eritromicina (Khan, 1980), Tn4001 portador de genes que codifican la resistencia a kanamicina, tobramicina y gentamicina (Lyon, 1984), Tn4003 codifica la resistencia a trimetoprim (Rouch, 1989), Tn552 contiene el gen operón *bla* que le confiere resistencia a penicilina (Rowland, 1989) por la producción de penicilinasa y Tn554 que contiene los genes *ermA* para la resistencia a eritromicina y el gen *spc* que codifica la resistencia a espectinomicina (Murphy, 1985). Los dos elementos más utilizados en la transferencia genética son Tn551 y Tn554. Tn554 se encuentra con gran frecuencia en el cromosoma de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) y se ha utilizado para el seguimiento epidemiológico de clones epidémicos SARM (Kreiwirth, 1990; Figueiredo, 1991; De Lancastre, 1994; Domínguez, 1994).

2. Resistencia antibiótica en *S. aureus*

2.1. Generalidades. Principales grupos de antibióticos con actividad frente a *S. aureus*

Los antibióticos son fármacos utilizados para el tratamiento de las enfermedades infecciosas producidas por bacterias. Se caracterizan por que su diana farmacológica no está localizada en un determinado tejido del organismo humano sino en una bacteria hospedada accidentalmente o permanentemente en el hombre. Por lo tanto, la molécula del antibiótico a utilizar debe ser por un lado, lo más tóxica posible para la bacteria diana de actuación, y por otro lado lo menos tóxica posible para el hospedador de esta bacteria.

Los antibióticos pueden ejercer su acción de forma bacteriostática (inhibiendo temporalmente el crecimiento de la bacteria) ó bactericida (destruyendo la viabilidad celular), mediante los siguientes procesos (Figura 2.1):

- 1- Inhibiendo la síntesis de la pared celular, como β -lactámicos y glucopeptidos que actúan inhibiendo distintos procesos implicados en la síntesis del péptidoglicano.
- 2- Inhibiendo la síntesis proteica, actuando a diferentes niveles en las subunidades ribosomales 30S y 50S, como ocurre con los antibióticos del grupo de los: aminoglicósidos, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, cetólidos, cloranfenicol, ácido fusídico o mupirocina.
- 3- Bloqueando la síntesis de los ácidos nucleicos, como sulfonamidas y trimetoprím que actúan inhibiendo el metabolismo del ácido fólico, quinolonas que interfieren en la síntesis de la replicación del ADN por inhibición del ADN-girasa o rifampicina que afecta a la transcripción inhibiendo la ARN-polimerasa dependiente del ADN.

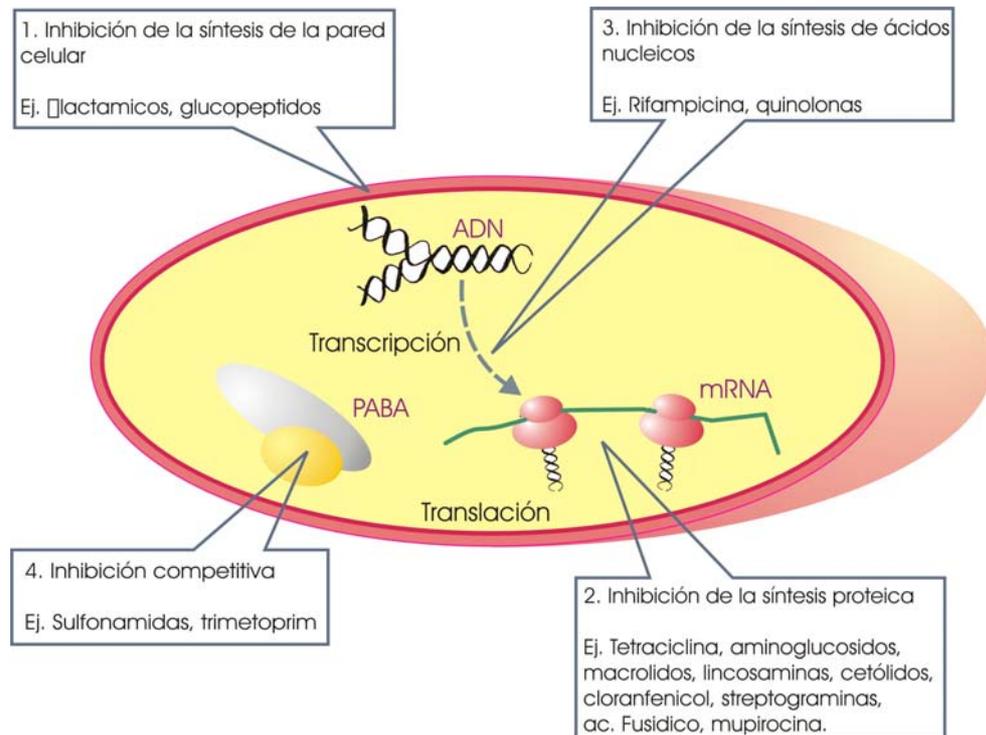


Figura 2.1- Dianas de los antimicrobianos usados en el tratamiento de infecciones estafilocócicas. PABA: ácido paraaminobenzoico.

Merecen una mención especial los mecanismos de acción de los antibióticos β-lactámicos, del grupo antibiótico compuesto por macrólidos-lincosamidas-estreptograminas-cetólidos (MLSK) y de los glicopéptidos (Jehl, 2004) y de la mupirocina:

Mecanismos de acción de los β-lactámicos: Los β-lactámicos son los antibacterianos más utilizados, tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario debido a sus cualidades: actividad bactericida, eficacia, escasa toxicidad y amplio margen terapéutico. Son ácidos orgánicos, la mayoría son solubles en agua y se ionizan en solución, hecho que dificulta su difusión a través de las membranas. Actúan sobre el peptidoglicano de la pared celular bacteriana, inhibiendo la última etapa de su síntesis e induciendo su destrucción. Para ello, deben llegar a su diana de actuación, las PBPs o proteínas que se unen a las penicilinas *-penicillin binding proteins-*, situadas en la parte externa de la membrana citoplasmática. La inactivación de las PBPs se hace por formación

de complejos covalentes con los β -lactámicos. Por lo tanto, el efecto de un determinado β -lactámico depende de la afinidad que tenga por las diferentes PBPs, ya que cada β -lactámico tiene una afinidad máxima para una PBP concreta. Esta afinidad se define a concentraciones bajas de antibióticos, puesto que si se aumenta la concentración, pueden ser inhibidas otras PBPs.

Mecanismos de acción del grupo macrólidos-lincosamidas-estreptograminas-cetólidos (MLSK): Los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas son antibióticos muy usados en el tratamiento de infecciones estafilocócicas. Actúan a nivel del ARN ribosomal 23S de la subunidad 50S del ribosoma. Inhiben la fase de elongación de la síntesis proteica por bloqueo de la translocación o de la transferencia peptídica.

Los cetólidos son derivados de la eritromicina A, macrólido de 14 átomos de carbono. El primer cetólido comercializado, la telitromocina, actúa por inhibición del ensamblaje de las subunidades 30S y 50S y por bloqueo de los péptidos, por lo que inhibe igualmente la síntesis de proteínas.

Los macrólidos y lincosamidas se consideran agentes bacteriostáticos. Las estreptograminas A y B por separado son bacteriostáticos, mientras que en conjunto son sinérgicos y actúan como bactericidas.

Mecanismos de acción de los glucopéptidos: La vancomicina, glucopéptido propiamente dicho, y la teicoplanina, antibiótico lipoglucopeptido, poseen un excelente actividad frente a bacterias grampositivas. El mecanismo de acción de ambos fármacos consiste en inhibir la síntesis de la pared bacteriana, impidiendo la polimerización del peptidoglicano, mediante la formación de un complejo con el precursor D-alanil-D-alanina. Secundariamente alteran la permeabilidad celular y la síntesis de RNA. Ejercen una rápida acción bactericida, pero sólo sobre bacterias en crecimiento activo.

Mecanismos de acción de la mupirocina: La mupirocina es un antibiótico tópico especialmente útil en el control de la diseminación hospitalaria de *S. aureus* resistente a meticilina. Su acción se produce inhibiendo la síntesis

proteica de la bacteria mediante inactivación competitiva del enzima isoleucil-tRNA sintetasa (Morton, 1995; Yao, 1999). Tiene actividad bactericida cuando actúa a concentraciones elevadas.

S. aureus podría considerarse uno de los principales patógenos en constante evolución ya que se adapta rápidamente a las diferentes condiciones ambientales (Lowy, 1998), gracias a su capacidad de cambio, en la sensibilidad a los antimicrobianos y en los factores que regulan su virulencia.

A medida que se van introduciendo nuevos antibióticos, las bacterias desarrollan diferentes mecanismos para neutralizarlos. En la tabla 2.1 se resumen los mecanismos de resistencia más importantes y los genes de resistencia asociados en *S. aureus* (Paulsen, 1997; Proján, 2000).

Tabla 2.1- Mecanismos de resistencia a los antibióticos en *S. aureus* y genes asociados.

Antimicrobiano	Diana celular	Genes de resistencia	Mecanismo de resistencia
β-lactámicos	β-lactamasa	<i>blaZ</i>	Hidrólisis enzimática del núcleo β-lactámico
	PBP2a	<i>mecA</i>	Baja afinidad para PBPs
Aminoglucósidos	RNAr 30S	<i>aacA-aphD</i> , <i>aadA</i> , <i>aadD</i> , <i>aphA</i> , <i>aphC</i> , <i>spc</i> , <i>strA</i>	Modificación por acetiltransferasas, adeniltransferasas o alteración ribosomal de las fosfotransferasas
Cloranfenicol	RNAr 50S	<i>cat</i>	Modificación por acetiltransferasa
Fluoroquinolonas	DNA girasa	<i>gyrA /gyrB</i> <i>norA</i> <i>griA</i> (ó <i>parC</i>)	Mutaciones en los genes de la DNA girasa, Bombas de expulsión, Mutaciones en el gen de la DNA topoisomerasa IV
Fosfomicina	Síntesis del ácido N-acetil murámico	<i>fosB</i>	Modificación por una glutatone-S-transferasa
Ácido fusídico	Factor de elongación G	<i>fusA/fusB</i>	Alteración en el factor de elongación G / disminución de la permeabilidad
Glucopéptidos	Complejos D-Ala-D-Ala	Desconocido <i>vanA</i>	Secuestro por la pared celular
Macrólidos, lincosamidas	RNAr 50S	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i>	Metilación del RNAr. Bombas de expulsión
Mupirocina	Isoleucil-RNAt-sintetasa	<i>mupA</i>	Producción de una isoleucil-RNAt-sintetasa modificada
Rifampicina	Subunidad β de la RNA polimerasa	<i>rif</i>	Alteraciones en la RNA polimerasa
Sulfonamidas	Síntesis de ácido tetrahidrofólico	<i>sulA</i>	Sobreproducción de ácido p-aminobenzoico
Tetraciclinas	RNAr 30S	<i>tetA(K)</i> / <i>tetA(L)</i> <i>tetA(M)</i>	Bombas de expulsión Protección ribosomal
Trimetoprím	Síntesis del ácido tetrahidrofólico	<i>dfrA</i>	<i>Bypass</i> , por una dihidrofolato reductasa

Las bacterias pueden adquirir resistencia a los antibióticos, mediante mutación de sus genes ó por adquisición de genes resistentes de otras bacterias ó virus. Esta “transferencia” puede ser por transducción ó por

transformación cuando el intercambio genético se realiza entre bacterias de la misma especie ó de especies genéticamente muy próximas, y por conjugación cuando se intercambian genes entre diferentes especies, a través de transposones y plásmidos conjugativos.

2.2. Evolución de la resistencia antibiótica en *S. aureus*

S. aureus fue el primer microorganismo en poner de manifiesto la resistencia a los antimicrobianos y ser capaz de desarrollar múltiples mecanismos, intrínsecos o adquiridos, que le han ido confiriendo resistencia a la mayoría de los antimicrobianos adecuados para el tratamiento de la infección estafilocócica.

En los primeros años de la década de 1940 se introduce de forma terapéutica la penicilina en el tratamiento de las infecciones estafilocócicas. Poco tiempo después, se empiezan a describir aislamientos de *S. aureus* con resistencia a penicilina debido a la producción de betalactamasas (Barber, 1947).

Durante la década de los años 1950, a medida que se iban adquiriendo resistencias a los antibióticos conocidos, se fueron introduciendo en la práctica clínica nuevos antibióticos. Así, en 1957, muchas cepas de *S. aureus* presentaban resistencia múltiple a penicilina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol y eritromicina (Shanson, 1981).

En 1959 se introduce la meticilina, una penicilina semisintética que resiste la acción de la betalactamasa que degrada la penicilina. Ésta nueva droga permite volver a tener un control sobre las infecciones por *S. aureus*. Sin embargo, ésta nueva situación va a durar poco, ya que en 1961 aparecen las primeras cepas resistentes a meticilina aisladas en Inglaterra por Jevons y Knox (Jevons, Knox, 1961). Dos años después aparece el primer brote epidémico de infección nosocomial por *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) en el Reino Unido (Stewart, 1963) Estos aislamientos de *S. aureus* resistentes a meticilina presentan resistencia intrínseca a todos los β -lactámicos, incluídas las cefalosporinas y carbapenemes.

La resistencia de *S. aureus* a aminoglucósidos parece estar relacionada en su inicio con el uso tópico. Los primeros aislamientos resistentes a este

grupo de antibióticos se detectaron en 1959 en Estados Unidos y es en los años 70 cuando aparecen los primeros casos en Europa (Crossley, 1979).

A finales de los años 80 se encuentran cepas de *S. aureus* que combinan la resistencia a meticilina con la resistencia a otros muchos grupos antibióticos incluyendo cloranfenicol, tetraciclina, macrólidos, lincosaminas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Schaefer, 1989). En la última década se han documentado casos de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a glucopéptidos (Hiramatsu, 1997) y recientemente se han descrito casos en Estados Unidos de cepas de *S. aureus* con resistencia de alto nivel a vancomicina (CDC, 2002; Chang, 2003; CDC, 2004; Tenover, 2004).

2.3. Resistencia a meticilina en *S. aureus*

2.3.1. Generalidades. Penicilinas semisintéticas

Los antibióticos β -lactámicos constituyen uno de los grupos más importantes dentro de la terapéutica antiinfecciosa, puesto que continúan siendo el tratamiento de primera elección en numerosos procesos infecciosos. Su descubrimiento se debe a Fleming quien en 1928 denominó Penicilina a la sustancia producida por un hongo, *Penicillium notatum*, que provocaba la lisis de diferentes especies de *Staphylococcus* (Fleming, 1929).

La familia de los antibióticos β -lactámicos se define químicamente por la presencia de un anillo betalactámico, que en sí mismo carece de actividad antimicrobiana necesitando ser activado por otros radicales para que pueda unirse a las dianas donde ejerce su acción (PBPs) (Neuhaus, 1992). La naturaleza de los radicales esenciales que se unen al anillo betalactámico define las diferentes clases o grupos de antibióticos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactamas, carbapenemas, e inhibidores de betalactamasas).

Las penicilinas son un grupo de antibióticos de origen natural y semisintético, que tienen un núcleo base común que es el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) (figura 2.2). Posee una cadena lateral (R) en la posición 6 que varía de unas penicilinas a otras y es la que define sus

propiedades farmacocinéticas, el espectro, la actividad y la resistencia a betalactamasas.

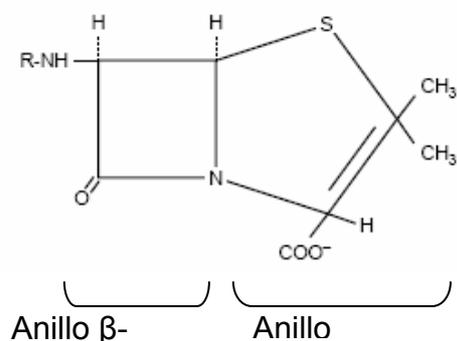


Figura 2.2- Estructura química del ácido 6-aminopenicilánico, formado por el anillo β -lactámico, el anillo de tiazolidina y la cadena lateral (R).

La primera penicilina natural, la penicilina G o benzilpenicilina, se obtuvo en 1929 del hongo *Penicillium chrysogenum* y se introduce de forma terapéutica en la década de los 40 para el tratamiento de infecciones estafilocócicas (Abraham, 1941), pero su actividad fue rápidamente anulada por la capacidad de los estafilococos para producir penicilinasas o betalactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico inactivando los antibióticos betalactámicos (Kirby, 1944).

Con objeto de evitar la acción degradativa de la penicilinasas, se modificó la estructura química del 6-APA mediante la agregación de distintas cadenas laterales, lo que permitió desarrollar un nuevo grupo de antibióticos β -lactámicos, las penicilinas semisintéticas. La primera de este grupo es la dimetoxibenzil penicilina o meticilina cuya cadena lateral la hace resistente a la acción hidrolítica de la betalactamasa estafilocócica. Presenta el inconveniente de que es inestable al pH gástrico y requiere administración parenteral, por lo que posteriormente se fueron sintetizando nuevos compuestos ácido-estables como la oxacilina, cloxacilina y flucloxacilina.

2.3.2. Mecanismos de resistencia en *S. aureus*

Se han descrito diferentes tipos de mecanismos de resistencia de *S. aureus* a los β -lactámicos, muchas veces relacionados entre sí:

- **Resistencia mediada por β -lactamasas:** La resistencia se debe a la producción de una penicilinas plasmídica, inducible, que inactiva la penicilina G, las carboxipenicilinas y las ureidopenicilinas. El mecanismo de inducción consiste en que la penicilina y sus análogos favorecen la producción de una proteína antirrepresora que, al inhibir el gen represor de la betalactamasa (gen *blaI*), aumenta la síntesis de penicilinas (Imsade, 1978). Esta penicilinas es inactivada por los inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam). Las cefalosporinas no son hidrolizadas.

- **Fenómeno de tolerancia:** Afecta a todos los β -lactámicos. Implica que para la lisis y muerte del microorganismo se requieren concentraciones de antibiótico mucho más elevadas que para la inhibición de su crecimiento. Significa una disminución de la actividad autolítica por exceso de inhibidor de autolisinas, lo que conlleva un efecto bactericida más lento (Sabath, 1977). Se desconoce su base genética.

- **Resistencia a la meticilina:** La meticilina es una penicilina semisintética que resiste la acción de la betalactamasa que degrada la penicilina. La resistencia a meticilina implica resistencia intrínseca a todos los β -lactámicos, incluidas cefalosporinas y carbapenemes. Puede ser debida a varios mecanismos, en función de que contengan o no el gen *mecA*.

2.3.2.a. Modificación de la diana

El mecanismo de resistencia a meticilina fue descubierto en 1981 con la identificación de alteraciones en la afinidad de las proteínas que se unen a las penicilinas o PBPs -penicillin binding proteins- en SARM (Hayes, 1981; Hartman, 1981).

Las PBPs son enzimas localizados en la membrana bacteriana que catalizan las reacciones de transpeptidación del peptidoglicano durante la síntesis de la pared celular (Berger-Bächi, 1994, Guysen, 1994). Las cepas de estafilococos se caracterizan por producir al menos cuatro PBPs (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4) (Chambers, 1994) que son inhibidas por los beta-lactámicos, incluida la meticilina. Las cepas SARM además de sintetizar estas proteínas, se caracterizan por desarrollar una PBP de baja afinidad por los antibióticos beta-lactámicos, denominada PBP 2a ó PBP 2'. Esto permite que cuando las PBPs 1, 2, 3 y 4 están inhibidas por la presencia de meticilina, la PBP2a continúa activa manteniendo la síntesis de la pared celular (De Lencastre, 1991). La

PBP2a difiere del resto de PBPs en que en su lugar activo se bloquea la unión a cualquier beta-lactámico, pero permite que la reacción de la transpeptidación continúe su proceso (Lim, 2002). Las cepas de *S. aureus* que son resistentes a meticilina por este mecanismo, lo son también a todos los beta-lactámicos, incluyendo las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactámicos.

Gen *mecA*

El determinante genético de resistencia a meticilina es el gen *mecA*, de localización cromosómica, que codifica la síntesis de la PBP2a (Hartman, 1984; Ubukata, 1985; Chambers, 1985; Chambers, 1987). Esta secuencia cuenta con dos genes reguladores: el gen *mecR1* ó gen regulador de la señal de transducción del gen *mecA* y el gen *mecI*, que codifica la proteína represora de la transcripción del gen *mecA* (Figura 2.2) (De Lencastre, 1994). La transcripción del gen *mecA* se produce cuando el beta-lactámico llega a la célula y se une al receptor-dominio de unión a penicilina de la membrana citoplasmática codificado por el gen *mecR1*, desencadenando una señal que induce a la proteasa autocatalítica a unirse a *mecI*, el cual está bloqueando la región operadora de *mecA*. De ésta manera queda libre el operador de *mecA* siendo posible la expresión de PBP2a (Zhang, 2001; Archer, 2001; Hiramatsu, 2001).

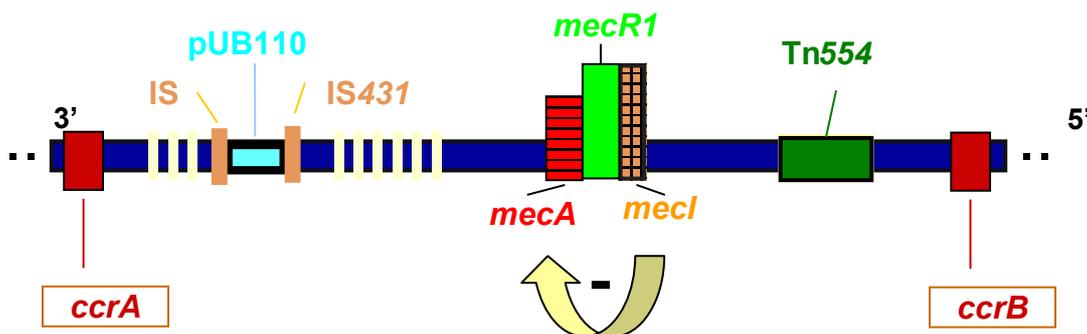


Figura 2.2- Representación de un fragmento del DNA cromosómico de SARM con los siguientes elementos: región reguladora del gen *mecA* compuesta por los genes *mecI* y *mecR1*, plásmidos (pUB110), secuencias de inserción (IS431), transposones (Tn554) y genes cromosómicos de las recombinasas A y B (*ccrA*, *ccrB*)

Se han descrito otros genes de naturaleza cromosómica que no están comprendidos en el gen “*mec*” y que son esenciales para la expresión fenotípica de la resistencia. Son los denominados genes “*fem*” A-F (factores esenciales para la expresión de la resistencia a meticilina), están tanto en las cepas de *S. aureus* sensibles como en las resistentes (Berger-Bächli, 1989; De Lencastre, 1994) y los genes *chr*^{*}. Estos últimos son genes cromosómicos cuyas mutaciones conllevan una resistencia de alto nivel a meticilina en presencia de PBP2a y que difieren del operón *femAB*. Hasta el momento se desconoce su posición dentro del cromosoma (Riffel, 1994; Strandén, 1996). Katayama *et al.* han realizado algunos trabajos en los que describen que la resistencia de alto nivel a los β -lactámicos es más elevada cuanto mayor es el número de mutaciones que se producen en el gen *mecA* y en su secuencia reguladora, mientras que las mutaciones cromosómicas, en una zona ajena a éstos genes, juegan un papel mucho menor (Katayama, 2004).

El gen *mecA* se encuentra distribuido, de forma amplia, tanto entre *S. aureus* como entre otras especies de estafilococos coagulasa-negativa resistentes a meticilina. Se han descrito distintas hipótesis sobre el origen del gen *mecA*, fragmento de DNA de 2.1 Kb, en un principio se pensó que podría haberse originado de una especie estafilocócica distinta de *S. aureus* (Beck, 1986; Berger-Bächli, 1994), posteriormente se sugirió la hipótesis de que pudiese haber sido adquirido de algunas especies de estafilococos coagulasa negativos (Archer, 1994). Algunos estudios han encontrado una homología del 88% entre el gen *mecA* de *S. aureus* y el gen *mecA* de *S. sciuri* (Couto, 1996; Wu, 1996). *In vitro* se ha comprobado que el *mecA* de *S. sciuri* al introducirlo en *S. aureus*, participa en la síntesis de su pared celular produciendo resistencia de alto nivel a los β -lactámicos (Severin, 2005). También se ha demostrado *in vivo* la transferencia del gen *mecA* desde *S. epidermidis* a *S. aureus* (Wielders, 2001).

Existen dos teorías básicas para explicar la evolución del gen *mecA* en cepas de *S. aureus* y la extensión de éste entre distintas líneas filogenéticas bacterianas. Inicialmente, se sugirió que las cepas contemporáneas de SARM derivaban de unos pocos clones en los que se había integrado el gen *mecA* y que habían seguido líneas evolutivas distintas (Kreiswirth, 1993). Estudios más

recientes ponen en evidencia, sin embargo, que el gen *mecA* se ha transferido entre distintas líneas genéticas de *S. aureus*, pudiendo decirse que la transferencia horizontal del gen *mec* ha sido de gran importancia en la evolución de SARM (Enright, 2000; Enright 2002; Wielders, 2002; Hiramatsu, 2004). En este sentido, los resultados obtenidos de estudios realizados mediante análisis de *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) (Musser, 1992), *multilocus sequence typing* (MLST) (Enright, 2002) y *electroforesis en campo pulsátil* (PFGE) están a favor de una transferencia horizontal del *mecA* entre cepas pertenecientes a líneas genéticas diferentes (Hanssen, 2004)

Staphylococcal cassette chromosome mec

El gen *mecA* forma parte de una estructura de *cassette* en el cromosoma estafilocócico denominada SCCmec (*Staphylococcal Cassette Chromosome Mec*) (Ito, 1998; Katayama, 2000). El SCCmec es un elemento genético móvil, insertado en el cromosoma de SARM en una localización específica, en el extremo 3' del fragmento de lectura abierta (ORF) *orfX* cuya función es desconocida, por el momento. (Ito, 1999; Kuroda, 2001; Baba, 2002). Su movilidad se debe a la presencia de dos genes específicos únicos, *ccrA* y *ccrB*, que codifican las denominadas recombinasas del cassette cromosómico A y B. Éstas son recombinasas polipeptídicas, homólogas con las recombinasas de la familia invertasa/resolvasa, y son las responsables de la integración y escisión cromosómica del SCCmec (Ito, 1999; Ito, 2001; Katayama, 2000).

Se han descrito distintos tipos de SCCmec en función de las características de los genes *ccr* y secuencias adyacentes, así como de la secuencia de la zona *mec* y sus genes reguladores. También se diferencian según los determinantes genéticos adquiridos como resultado de la integración de plásmidos y transposones (Ito, 2001). Hasta el momento, se han descrito cinco tipos de SCCmec (I-V) y un determinado número de variantes ó subtipos (IA, IIIA, IIIB, IVA, IVB, IVC) (Ito, 2001; Oliveira, 2001; Ma, 2002; Okuma, 2002;) clasificados en base a la secuencia de la región J (junkyard), siendo siete las últimas variantes descritas (IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IVE y IVF) (Shore, 2005). Los diferentes tipos varían en la composición genética y en el tamaño (de ~ 20Kb a 68Kb) (Ito, 2004) (Figura 2.3).

- Tipo I SCCmec: Comienza su diseminación entre las cepas de SARM en los años 60, en Inglaterra, coincidiendo con el principio de la era antibiótica. Tiene un tamaño de 34Kb. Está formado por el complejo de genes *ccr* tipo 1 (*ccrA1*, *ccrB1*) y el complejo *mec* clase B (*mecA*, *mecR1* y una copia cortada de la secuencia de inserción IS1272). También contiene la inserción IS431. No posee ningún gen de resistencia excepto el *mecA*.

- Tipo II SCCmec (53 Kb): Se aísla en 1982 y es frecuente entre las cepas de SARM de Japón, Corea y EEUU (Hiramatsu, 2001). Comprende el complejo de recombinasas tipo 2 (*ccrA2*, *ccrB2*), el complejo *mec* clase A (*mecI*, *mecR1*, *mecA*), la inserción IS431, el plásmido pUB110 y el transposón Tn554.

- Tipo III SCCmec (67 Kb): Se ha descrito en los países europeos, Arabia Saudí, India, Singapur, Hong Kong, Australia y Nueva Zelanda (Ito, 2001). Lo componen el complejo de recombinasas tipo 3 (*ccrA3*, *ccrB3*), el complejo *mec* clase A, Tn554, pT181, pl256 y las secuencias de inserción IS431 y IS256. También contiene una copia cortada de genes *ccr* situada entre dos elementos IS431, esto sugiere la posibilidad de que el tipo III SCCmec pueda derivar de la fusión en el pasado de dos elementos SCC (Ito, 2001). Los tipos II y III SCCmec se encontraban en las cepas dominantes de los años 1980, caracterizadas por contener múltiples genes de resistencia antibiótica.

- Tipo IV SCCmec (21-24 Kb): contiene el complejo de genes *ccr* tipo 2 (*ccrA2*, *ccrB2*), el complejo *mec* clase B y la inserción IS1272. Es el elemento más pequeño, lo que le confiere mayor movilidad genética y no lleva factores de virulencia ni genes adicionales de resistencia para otros antibióticos que no sea meticilina (Ma, 2002). Esta característica también ocurre en un rango más amplio de grupos genéticos de SARM, sugiriendo que ha sido heterológamente transferido de otras especies estafilocócicas (Okuma, 2002). Posiblemente, estas mismas características hacen que el SCCmec tipo IV se encuentre asociado a cepas SARM adquiridas en la comunidad (Daum, 2002; Okuma, 2002). Sin embargo, esta asociación no es única, en un estudio reciente realizado en Brasil en 151 hemocultivos de SARM, se describe que aunque el tipo IV es más frecuente entre los SARM adquiridos en la comunidad, también se encuentra entre las cepas de adquisición hospitalaria, ya que el 95% de las cepas estudiadas con origen nosocomial eran tipo IV (De A Trindade, 2005).

- Tipo V SCCmec ó “New Type” (28 Kb): a diferencia de los otros tipos este posee un nuevo gen *cc* denominado *ccrC*. Se ha encontrado en Australia en un pequeño número de cepas SARM de origen comunitario y aún está en investigación (Okuma, 2002; Ito, 2004).

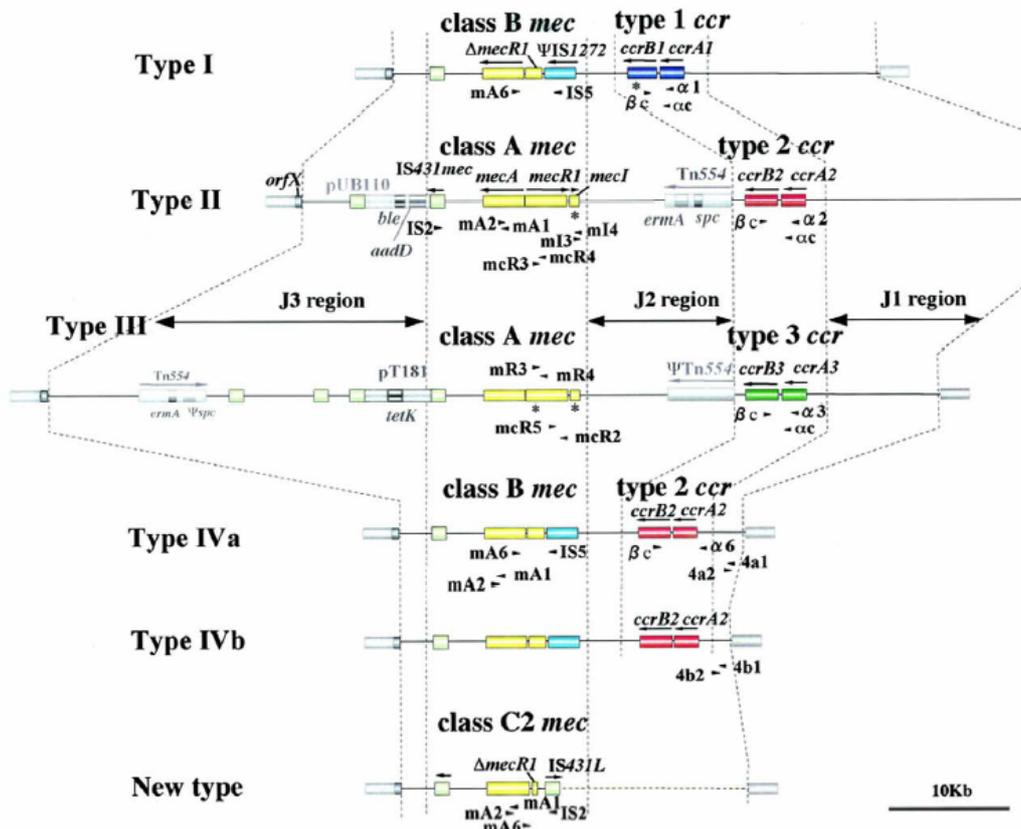


Figura 2.3- Representación de los diferentes tipos de SCCmec. Los distintos tipos de SCCmec se diferencian por las características del complejo *ccr* y del complejo *mec*. El SCCmec tipo I está formado por la asociación del *ccr* tipo 1 con el complejo *mec* clase B (*mecR1*-*mecA* -*IS1272*); El tipo II: *ccr* tipo2 y el complejo *mec* clase A (*mecI*-*mecR1*-*mecA*); Tipo III: *ccr* tipo 3 y complejo *mec* clase A; tipo IV: *ccr* tipo 2 y complejo *mec* clase B.

Los tipos más pequeños, SCCmec I, IV y V, contienen sólo genes reguladores para resistencia a meticilina, por el contrario los tipos SCCmec II y III llevan elementos de transposición y genes que codifican resistencia a antibióticos no beta-lactámicos (Ma, 2002; Ito, 2004). Así, el Tn554 codifica resistencia a eritromicina y espectinomicina y ψ Tn554 a cadmio. En cuanto a

los plásmidos, el pUB110, codifica resistencia a kanamicina-tobramicina y bleomicina y pT181 contiene genes de resistencia a tetraciclinas y a mercurio (Ito, 2001).

El origen del SCCmec no se conoce aunque hasta ahora no se ha encontrado en ninguna otra especie de otro género que no sea estafilocócico. La presencia de la secuencia de inserción IS1272 prevalente en *S. haemolyticus*, en los tipos I y IV SCCmec de *S. aureus* hace pensar en la posibilidad de que, en el pasado, el tipo I SCCmec haya sido transferido de *S. haemolyticus* a *S. aureus* (Archer, 1996). El gen *pIs* que forma parte del tipo I SCCmec en el *S. aureus*, también se ha visto que se encuentra en el *S. sciuri* (Juuti, 2005), lo que contribuye a evidenciar que se produce un constante intercambio genético entre especies estafilocócicas. Katayama *et al* han realizado estudios con *S. hominis* y el SCCmec de *S. aureus* (Katayama, 2003) para probar la hipótesis de que existe una familia de elementos genéticos móviles (SCCs) que servirían para transferir información genética entre especies estafilocócicas y que el SCCmec estaría especializado para transferir la resistencia a meticilina (Ito, 1999).

Estudios realizados por Oliveira *et al.* sobre la evolución de clones pandémicos en Europa, con la identificación al menos de cinco líneas genéticas divergentes de SARM, junto con la evidencia de cuatro tipos mayores de SCCmec en cepas de SARM con un fondo genético común, han sugerido que la aparición de clones epidémicos de SARM se debe en parte al resultado de la transferencia horizontal del gen *mec*, junto con la capacidad de adaptarse a nuevos contextos genéticos, como puede ser la transmisión eficiente de clones de SARM (Oliveira, 2001; Oliveira, 2002).

Otros estudios genotípicos basados en análisis de secuencias, MLST (*multilocus sequence typing*), también evidencian que el SARM ha surgido de múltiples adquisiciones del gen *mec* dentro del *S. aureus* (Enright 2000, Enright 2002).

2.3.2.b. Resistencia a meticilina no mediada por el gen *mecA*

Se han descrito otros mecanismos de resistencia a meticilina en cepas que no son portadoras del gen *mecA* y que se asocian a CMI's de meticilina entre 8 y 16 $\mu\text{g/mL}$ (Jehl, 2004). Estos mecanismos son los siguientes:

- Hiperproducción de penicilinasa, son las denominadas cepas BORSA (*borderline S. aureus*). Sintetizan una cantidad importante de β -lactamasa y no tienen ni el gen *mecA* ni la PBP2a. En estas cepas la sensibilidad a la oxacilina puede recuperarse cuando se asocia con un inhibidor de β -lactamasa, siendo éste el mejor método para su detección fenotípica. No suelen presentar resistencia asociada a otros grupos antibióticos (McDougal, 1986)

- Determinadas cepas parecen producir una meticilinasasa capaz de hidrolizar la meticilina en ausencia del gen *mecA*, pero su relevancia y el gen responsable no están claramente establecidos (Massidda, 1996)

- Modificación de las PBPs habituales en *S. aureus*, son las cepas MODSA (*modified S. aureus*), cepas resistentes de bajo nivel a la oxacilina y no productoras de β -lactamasa. Estas cepas presentan una modificación en la afinidad de sus PBPs normales frente a los β -lactámicos, ello puede ser debido a la hiperexpresión de alguna de estas PBPs o la consecuencia de mutaciones genéticas que alteren la afinidad de la proteína final por el antibiótico (Sierra-Madero, 1988; Tomasz, 1989).

En la tabla 2.2 se representan los distintos fenotipos de resistencia a los β -lactámicos.

Tabla 2.2- Fenotipos de resistencia adquirida de los estafilococos a los β -lactámicos.

Mecanismo	Penicilina G, Carboxipenicilina Ureidopenicilina	Penicilina + Inhibidor de β -lactamasa	Oxacilina	Cefalosporinas Carbapenems
Salvaje	S	S	S	S
Penicilinasa	R	S	S	S
Modificación de las PBP, gen <i>mecA</i>	R	R	R	R
BORSA (raro)	R	S/R	R	S
MODSA (raro)	S	S	R	S

BORSA: borderline *S. aureus*; MODSA: diana modificada en *S. aureus*.

Aunque aún está por determinar la frecuencia relativa de cada uno de los tipos de resistencia, se puede dar la posibilidad de que en una misma cepa de SARM coexistan distintos mecanismos (Chambers, 1989).

2.4. Resistencia a los antibióticos del grupo macrólidos-lincosamidas-estreptograminas-cetólidos (MLSK)

2.4.1. Características generales de los antibióticos del grupo MLSK

Los macrólidos, con las lincosamidas, las estreptograminas y los cetólidos constituyen el grupo de antibióticos denominado MLSK. A pesar de tener estructuras químicas diferentes, poseen mecanismos de acción y de resistencia e indicaciones clínicas semejantes (San Román, 2003).

Los macrólidos son antibióticos de naturaleza lipídica obtenidos del género *Streptomyces* y *Micromonospora*. Su estructura química consiste en un anillo lactónico macrocíclico unido por un enlace glucosídico a desoxiazúcares aminados. El número de átomos de carbono del anillo lactónico permite clasificar los macrólidos en 3 grupos: macrólidos de 14 átomos (eritromicina), de 15 átomos (claritromicina, azitromicina), de 16 átomos (espiramicina, josamicina). El antibiótico tipo es la eritromicina. Está formada por una mezcla

de compuestos, de los cuales la eritromicina A es el más representativo (San Román, 2003; Sábada, 2004).

Las lincosamidas incluyen dos antibióticos: la lincomicina y su derivado clorado, la clindamicina, se utiliza en clínica por su mejor biodisponibilidad y mayor actividad. Desde el punto de vista químico están constituidos por un ácido aminado y un azúcar unidos por una amida (San Román, 2003; Sábada, 2004).

Las estreptograminas son antibióticos producidos por diferentes especies del género *Streptomyces*. Los dos componentes son la quinupristina (estreptogramina B) y la dalfopristina (estreptogramina A), derivados solubles semisintéticos. Químicamente no están relacionadas pero actúan de forma sinérgica. La estreptogramina A es una macrolactona poliinsaturada y la estreptogramina B un hexapéptido cíclico (Nadler, 1999).

Los cetólidos son una nueva familia de antibióticos semisintéticos derivados de eritromicina A que han sustituido uno de los azúcares por un grupo ceto (Balfour, 2001). La pérdida del azúcar determina que la molécula sea menos sensible al pH ácido y al desarrollo de los mecanismos de resistencia bacteriana. Actualmente el único componente comercializado es la telitromicina.

2.4.2. Mecanismos de resistencia en *S. aureus*

La resistencia en este grupo de antibióticos puede producirse por cuatro mecanismos (Leclercq, 1991; Leclercq, 2002):

a) Modificación y alteración de la diana (RNA ribosomal 23S): por la acción de metilasas codificadas por genes *erm* (*A*, *B* y *C*, y en menor frecuencia *F* e *Y*). Es el mecanismo de resistencia más frecuente. Los genes *ermA* y *ermB* son cromosómicos y se encuentran en los transposones, Tn554 y Tn551 respectivamente, mientras que el gen *ermC* se localiza en un plásmido, pMS97, que está presente en *S. aureus* (Matsuoka, 1998). La presencia de genes *erm* confiere resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B, constituyendo el fenotipo MLS_B constitutivo o inducible. En el fenotipo MLS_B constitutivo la cepa es resistente a todos los macrólidos (con anillo de 14, 15 o 16 átomos), a las lincosamidas, a los cetólidos y a las estreptograminas B. Las estreptograminas A no están

afectadas por lo que la asociación de ambos permanece activa. El fenotipo MLS_B inducible es el más frecuente, la resistencia afecta a macrólidos de 14 y 15 átomos, pero no a los de 16 átomos, lincosamidas, cetólidos y estreptograminas.

b) Expulsión activa del antimicrobiano “bombas de flujo”: codificada por los genes *msrA*, *msrB*, *erpA*, *vgaA* y *vgaB*. Los genes *msrA* confieren resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos y a estreptograminas dando lugar al fenotipo MS_B . Estos genes se encuentran en un plásmido, Pul5050 (Ross, 1990). Cuando la resistencia a eritromicina es mediada por *msrA*, la resistencia inducible a clindamicina no se produce.

c) Inactivación del antibiótico: genes *InuA*, *vatA*, *vatB*, *vatC*, *vgaA*, *vgaB*. El gen *InuA* confiere resistencia a lincosamidas y los genes *vat* y *vga* a estreptograminas.

d) Modificación de la diana por mutación del RNAr 23S y/o de proteínas ribosomales.

Estos últimos mecanismos de resistencia son muy poco frecuentes.

2.5. Resistencia a glucopéptidos

2.5.1. Características generales de los glucopéptidos

Los glucopéptidos son fármacos de espectro reducido, químicamente no se relacionan con ningún otro grupo de antibióticos. Son moléculas de estructura compleja que contienen un heptapéptido como estructura central. Sus diferencias residen en el primer y tercer aminoácido de la estructura heptapéptídica, los otros 5 aminoácidos son aromáticos y comunes a todos los glucopéptidos (Pigrau, 2003).

Los principales componentes que integran este grupo son vancomicina y teicoplanina.

La vancomicina producida por *Streptomyces orientalis*, fue aislada en 1950 pero hasta 1958 no fue introducida en la práctica clínica. Su uso estuvo limitado en el pasado ya que presentaba importantes efectos tóxicos. Posteriormente se redujo la toxicidad de la vancomicina y se introdujo en el mercado un segundo glucopéptido, la teicoplanina, producido por *Actynoplanes teichomycetus*, que posee escasos efectos tóxicos y es de fácil administración.

Ambos fármacos presentan una actividad similar frente a *S. aureus* (CMI₉₀ 1-2 µg/ml) (Cabeceran, 1999).

Los puntos de corte establecidos para la vancomicina en *S. aureus* según el Centers for Disease Control and Prevention (CDC) son, CMI 8-16 µg/ml se considera intermedio a vancomicina, y los aislamientos con CMI ≥ 32 µg/ml son resistentes a vancomicina. El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards) recomienda considerar sensibles los aislamientos de *S. aureus* con CMI a vancomicina de 4 µg/ml, mientras que el CDC recomienda estar alerta con estas cepas, ya que son las precursoras de los VISA y deben considerarse potencialmente intermedias.

La vancomicina se ha considerado el principal soporte de tratamiento para cepas de *S. aureus* resistente a meticilina durante más de 40 años, pero su uso excesivo ha llevado a la aparición de cepas SARM intermedias a vancomicina (VISA) y resistentes a vancomicina (VRSA) (Appelbaum, 2006). Ya en 1998, Kirst describe como el aumento en el uso de la vancomicina para tratar las infecciones causadas por estafilococos resistentes a meticilina es la causa que precede a la aparición de estafilococos con resistencia intermedia a vancomicina (Kirst, 1998). La primera resistencia estafilocócica a vancomicina fue descrita en una cepa de *Staphylococcus haemolyticus* (Schwalbe, 1987).

2.5.2. *Staphylococcus aureus* con resistencia heterogénea a vancomicina (VISA-heterorresistente) y *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA).

La posibilidad de que SARM adquiriese un mecanismo de resistencia a la vancomicina fue demostrada en el laboratorio (Noble, 1992) al estudiar la resistencia de los glucopéptidos en enterococos y conseguir la transferencia del plásmido *vanA* de *E. faecalis* a *S. aureus*. La posibilidad de que esto ocurriese en la clínica ha creado una gran preocupación en la comunidad científica.

En 1996 en Japón, se aísla la primera cepa de *S. aureus* con heterorresistencia a vancomicina (hetero-VISA) en un paciente con infección por SARM que no respondía al tratamiento con vancomicina (Hiramatsu, 1997). La cepa hetero-VISA (Mu3) presenta una CMI ≤ 4 µg/ml, pero posee

subpoblaciones resistentes que pueden crecer en presencia de concentraciones $>4 \mu\text{g/ml}$ de vancomicina (Hiramatsu, 1998). La importancia potencial de las cepas hetero-VISA es que pueden estar asociadas con tratamientos fallidos con glucopéptidos y ser precursoras de VISA. La evidencia de que una cepa hetero-VISA evolucionase a VISA durante el curso de una infección fue descrita en Nueva York (Sieradzki, 1999). El significado clínico de heterorresistencia a vancomicina está todavía en investigación.

En mayo de 1996 en Japón, un niño de 4 meses que había sido sometido a cirugía cardíaca desarrolló una infección de la herida quirúrgica con presencia de SARM. La evolución clínica fue desfavorable a pesar del correcto tratamiento con vancomicina. Esta cepa de SARM (Mu50) presentó una CMI a vancomicina de $8 \mu\text{g/ml}$ y carecía de los genes *vanA* y *van B*, por lo que se sospechó que se trataba de un mecanismo de resistencia intrínseco, por un incremento en la síntesis de la pared celular (Hiramatsu, 1997). Este aislamiento produjo un gran impacto en el mundo científico por tratarse de la primera cepa clínica descrita con estas características.

Posteriormente, en julio de 1997, se aisló en Michigan una nueva cepa VISA en un paciente sometido a diálisis peritoneal ambulatoria que sufrió una peritonitis (CDC, 1997). Un mes más tarde, una tercera cepa VISA se identificó en la sangre de un paciente de New Jersey (CDC, 1997). Sucesivamente se fueron publicando casos similares en diferentes países del mundo (Smith, 1999; Ariza, 1999) lo que implica la posibilidad de diseminación de estas cepas con el consiguiente problema terapéutico (Liñares, 2001) y su eventual escalada hacia una resistencia completa a vancomicina.

La resistencia a vancomicina (CMI $\geq 32 \mu\text{g/ml}$) en *S. aureus* es muy rara, por el contrario las cepas VISA y/o hVISA son más frecuentes, siendo la prevalencia de hVISA más alta que la prevalencia de VISA. La prevalencia de hVISA en el mundo oscila entre 0,5%-20% de SARM (Walsh, 2002) según el área geográfica. En Europa se encuentra entre 0-5%, siendo más frecuente en determinados países como Francia (Reverdi, 2001), Alemania (Geisel, 1999), Italia (Marchese, 2000), Holanda (van Griethuysen, 2003), España (Ariza, 1999) y Reino Unido (Aucken, 2000); En Asia oscila entre 0-20%, destacando en Hong-Kong (Wong, 1999), Japón (Hiramatsu, 1999; Furuya, 2001), y Korea

(Kim, 2002); En Sud-América la prevalencia es de 3%, en Brasil (dos Santos, 2000); y en Norte-América oscila entre 0-3%, en EEUU (Hubert, 1999).

2.5.3. *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA).

Recientemente, en el año 2002, se aislaron en EEUU cuatro casos de infección por *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA) con CMI's de 1024 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml y 256 µg/ml respectivamente. Ello ha creado una gran preocupación, ya que las cuatro cepas presentaban una resistencia completa a la vancomicina, diferente mecanismo de transmisión y no tenían ninguna relación epidemiológica. El primer aislamiento fue descrito en Michigan en junio de 2002 y se aisló en un catéter de un paciente de 40 años con diabetes, enfermedad vascular y fallo renal crónico. Previamente, el paciente había sido tratado con vancomicina por una úlcera crónica en el pie. En el mismo sitio de la infección se aisló también una cepa de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (CDC, 2002). El segundo aislamiento VRSA se aisló tres meses más tarde en Pensilvania procedente de una úlcera crónica en el pie de un paciente de 70 años con obesidad mórbida hipertensiva, que no había recibido tratamiento con vancomicina desde hacía 5 años (CDC, 2002; Tenover, 2004). Ambas cepas de *S. aureus* eran portadoras del gen *vanA* (Liu, 2003; Chang, 2003). El tercer aislamiento VRSA se aisló en Nueva York, en marzo de 2004 en la orina de un paciente ingresado en la unidad de larga estancia (CDC, 2004). En este paciente también se aislaron cepas de enterococo resistente a vancomicina. Una cuarta cepa de VRSA ha sido descrita en marzo 2005 en Michigan, aislada en una herida gangrenosa de un paciente de 78 años con historia previa de diabetes, enfermedad vascular y afectación renal. Anteriormente había recibido tratamiento con vancomicina debido a un reemplazamiento valvular. Aunque en la herida también se aisló *E. faecalis* sensible a vancomicina, en el screening de frotis rectal se halló un *E. faecalis* resistente a vancomicina (Rudrick, 2005).

En 1992 se demostró *in vitro* que el gen *vanA* de los enterococos podía transferirse por conjugación a *S. aureus* (Noble, 1992). Esto explicaría la aparición de VRSA en tres de los cuatro casos. La patogénesis de la transferencia del gen en el paciente de Pensilvania se desconoce. El gen *vanA* se encuentra en el transposón Tn1546 de los enterococos (Arthur, 1993).

Estudios recientes han demostrado que los operones *vanA* de los aislados VRSA de Michigan y Pensilvania están compuestos por diferentes estructuras moleculares (Clark, 2005) y que la CMI de la cepa VRSA de Pensilvania es más baja que la cepa de Michigan debido a la pérdida del plásmido que contiene el Tn1546 y no por una menor expresión del operón *vanA* (Périchon, 2004).

Al analizar los casos de *S. aureus* resistente a glucopéptidos, podríamos establecer una serie de factores de riesgo asociados con infecciones causadas por VRSA, como son: la edad, enfermedad de base como diabetes, hipertensión, inmunosupresión, fallo renal y cirugía previa, infecciones con alta carga bacteriana como endocarditis, abscesos y úlceras, e historia previa de tratamiento con vancomicina.

2.5.4. Mecanismos de resistencia en *S. aureus*.

Los mecanismos de resistencia a vancomicina en *S. aureus* son distintos según sea vancomicina intermedio ó vancomicina resistente (Schito, 2006). Las cepas VISA o hVISA no poseen genes *vanA*, *vanB* ó *vanC* que confieren resistencia a glucopéptidos de alto nivel en los enterococos, y se piensa que el mecanismo de resistencia es intrínseco, por un incremento en la síntesis de la pared celular (Hanaki, 1998) cuya base genética de regulación se desconoce y por una alteración del balance de las PBPs. Las cepas VISA sintetizan grandes cantidades de peptidoglicano aumentando la cantidad de residuos de D-alanil-D-alanina que se unen a las moléculas de vancomicina y las capturan, impidiendo así que estas moléculas alcancen su diana en la membrana citoplasmática.

Algunos elementos genéticos reguladores como *tcaA* que codifica una proteína transmembrana (Maki, 2004), y el gen regulador accesorio (*agr*) (Sakoulas, 2002, Sakoulas, 2003), se asocian con una disminución en la sensibilidad de *S. aureus* a los glucopéptidos, jugando un papel destacable en la expresión de resistencia a éstos antibióticos. En un estudio reciente, Hiramatsu describe la hipótesis de que hVISA es un precursor de VISA y que ambos fenotipos se expresan dependiendo de la presión selectiva en el uso de glucopéptidos y β -lactámicos (Hiramatsu, 2001). Otros estudios sugieren que cambios

estructurales y/o metabólicos en los ácidos teicoicos de la pared celular pueden jugar también un papel en el mecanismo de resistencia disminuyendo la velocidad de degradación de la pared celular, en vez de aumentar la velocidad en la síntesis de la pared, manteniendo así una correlación entre el grosor de la pared y la disminución de la sensibilidad para la vancomicina (Sieradzki, 2003).

Por el contrario, las cepas VRSA poseen el gen *vanA* y su resistencia se debe a una probable transferencia conjugacional del gen *vanA* de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina al *S. aureus* (Noble, 1992). Está causada por una alteración en el péptido terminal D-alanil-D-alanina a D-alanil-D-lactato, impidiendo la inhibición de la síntesis de la pared celular por la vancomicina.

Un estudio realizado por Howe *et al.* a 101 cepas de SARM con sensibilidad disminuida a glucopéptidos, aisladas en 9 países, demuestra que aunque estas cepas VISA pertenecen a las líneas clonales epidémicas descritas en el mundo, no hay una clara relación clonal de estas cepas entre sí (Howe, 2004).

Los sistemas de vigilancia europeos, SENTRY y EARSS, no han encontrado ninguna cepa resistente a vancomicina. En el 2001 se informó de cinco aislamientos VISA en Francia.

En los estudios multicéntricos realizados en nuestro país hasta el momento, no se han encontrado cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina y el aislamiento de cepas con sensibilidad disminuida a glucopéptidos es un hecho excepcional.

2.6. Resistencia a mupirocina.

2.6.1. Características generales de la mupirocina.

La mupirocina o ácido pseudomónico A es un antibiótico de origen natural, de uso tópico, cuya estructura química no se relaciona con la de otros antimicrobianos. Es producido por una cepa de *Pseudomonas fluorescens*. Su cadena lateral está formada por el ácido mónico que es el principal producto de su metabolismo.

2.6.2. Mecanismos de resistencia en *S. aureus*.

La resistencia a la mupirocina es debida a la modificación de la diana. Puede ser de dos tipos (Cookson, 1998):

- Resistencia de bajo nivel (CMI 8 a 256 mg/L): es de origen cromosómico. Se debida a la mutación en el gen codificante del enzima isoleucil- RNAt-sintetasa (*ileS*).

- Resistencia de alto nivel (CMI >256 mg/L): mediada por un plásmido que lleva el gen *ileS2* que codifica un enzima adicional de isoleucil-RNAt-sintetasa que no tiene afinidad por la mupirocina.

Hasta la actualidad es poco frecuente encontrar resistencia a mupirocina en *S. aureus*, pero según apuntan algunos autores su uso indiscriminado y tratamientos prolongados, desarrollan resistencias (Alarcón, 1998; Schmitz, 1998; Vásquez, 2000).

3. Historia de la resistencia a meticilina en *S. aureus*.

3.1. Aparición y evolución de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM)

La meticilina se comercializa en Europa durante el bienio 1959-1960. Un año después en Inglaterra, se detectan las primeras cepas SARM (Jevons, 1961) y en 1963 se describe el primer brote epidémico de infección nosocomial en el Reino Unido (Stewart, 1963). Desde entonces se ha observado la diseminación de cepas de SARM en muchos hospitales de diversos países, pudiendo documentarse varias ondas de diseminación global de diversos clones epidémicos.

En la década de 1970, se informa de un aumento de los aislamientos SARM que causan brotes de infección nosocomial en diferentes países europeos como el Reino Unido, Dinamarca, Francia y Suiza (Brenner, 1968; Parker, 1970). También se aíslan casos de SARM en otros países como Polonia, Turquía ó India, donde aún no se utilizaban las penicilinas semisintéticas (Ayliffe, 1997). En Estados Unidos comienzan a aislarse cepas SARM durante éstos años, pero no será hasta la década de los 80 cuando constituyan una causa importante de infección en los hospitales.

La aparición y diseminación de SARM se ve favorecida por la falta de medidas higiénicas para prevenir la difusión de microorganismos en los hospitales, y por la presión selectiva que conlleva el elevado consumo de antibióticos en dichos centros.

A finales de los años 70 se observó una disminución en la frecuencia de aislamientos SARM en Europa. Las razones de éste descenso se desconocen, pero es posible que contribuyera a ello una mejora en la práctica médica, en relación al control de la infección hospitalaria y al uso de los antibióticos (Ayliffe, 1997).

En la siguiente década (1980-1990), se produce una segunda onda de infección por SARM en los hospitales de Europa, Australia y Estados Unidos. En 1981 en Londres, se identifica una cepa epidémica -*Epidemic Methicillin Resistant S. aureus*- EMRSA-1, con un fagotipo y un fenotipo de resistencia similares a los de una cepa epidémica descrita en Australia (Cookson, 1988).

En Estados Unidos los aislamientos clínicos de SARM fueron aumentando progresivamente desde el 2,4% en 1975 hasta el 29% en 1991 (Panlilio, 1992). En Europa también se experimentó en este período un notable ascenso en su frecuencia, desde <1% en 1980 hasta un 30% en 1991. La prevalencia más alta se observó en los países del sur de Europa (alrededor de un 30% de SARM en Grecia, Francia y España), mientras que Holanda y Dinamarca presentaron la prevalencia más baja (6%) (Westh, 1992; Voss, 1994).

Estudios internacionales de vigilancia epidemiológica, indican que la prevalencia de SARM varía en función de los hospitales y de las regiones dentro de un país. Los datos del sistema de vigilancia SENTRY recogidos durante 1997-1999 informan que la prevalencia de SARM en los Estados Unidos fue del 34,2%, en Canadá del 5,7%, en América Latina del 34,9%, en Europa del 26,3% y en el Pacífico oriental del 46% (Diekema, 2001). Durante el período 1998-1999 en Sud-África fue del 40,4%, en Japón del 66,8% y en Australia del 22,4% (Bell, 2002).

Analizando la situación en Europa vemos que hay un gradiente de norte a sur, las cepas SARM son menos frecuentes en los países del norte que en los del sur de Europa. En estudios multicéntricos recientes como el SENTRY europeo (1997-99), en el que se recogen 3051 aislamientos de *S. aureus* en hemocultivos, se observa que la prevalencia de SARM en bacteriemias es más alta en Portugal (54%) e Italia (43-58%), que en Suiza y Holanda (2%). Dentro de un mismo país también existen variaciones entre hospitales y áreas geográficas, así por ejemplo, en España el porcentaje de SARM varió de un 34% en Sevilla a un 9% en el hospital Universitario de Bellvitge de Barcelona (Fluit, 2001). Éstas variaciones pueden deberse al tipo de población y muestra seleccionada en cada estudio, a la política antibiótica seguida en cada hospital, al tipo de enfermos atendidos y a las medidas de control tomadas ante nuevos casos de infección y/o colonización por SARM en cada institución.

Los datos anuales proporcionados por el sistema de vigilancia EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) indican que en la mayoría de los países, la proporción de SARM se sigue manteniendo relativamente estable, aunque en el año 2004 se ha producido un aumento de SARM en todos los países, respecto al año anterior. La prevalencia global de SARM durante 2003 fue del 21%, siendo más baja (<1%) en los países del

norte y más alta (>40%) en el sur de Europa e Israel, así como en el Reino Unido e Irlanda, obteniendo así que el porcentaje entre los países europeos varía de <1% en Islandia a un 51% en Grecia. Los datos del 2004 indican una prevalencia global ligeramente más alta, del 24%. Los países del norte de Europa siguen teniendo una prevalencia alrededor del 1%, en el sur de Europa, Bulgaria, España o Francia, las cifras están entre el 20-30% y en el Reino Unido e Irlanda el porcentaje de SARM es >30% (Figura 3.1). Así tenemos que el porcentaje de SARM está comprendido en un rango que va del 0% en Islandia al 73% en Rumania.

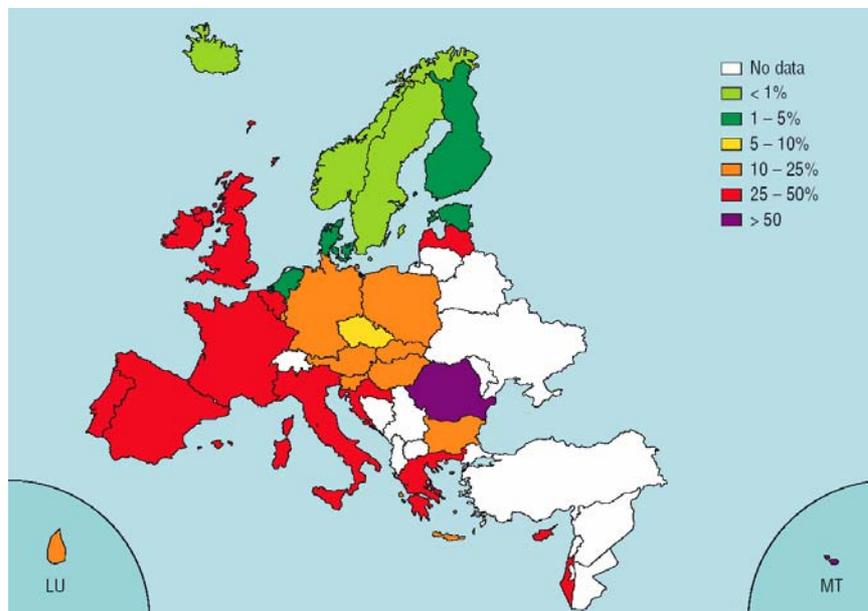


Figura 3.1- Distribución geográfica del porcentaje de bacteriemias de SARM durante el año 2004. Datos procedentes del estudio EARSS 2004, informe anual 2004. www.earss.rivm.nl

El aumento en el consumo de antibióticos es sin duda una de las principales causas de aparición de resistencias y la diferente presión selectiva antibiótica en cada país podría ser responsable de las variaciones de las tasas de resistencia que existen entre los países del norte y los del sur y este de Europa (Bronzwaer, 2000). Un estudio reciente realizado en 26 países europeos por el proyecto europeo sobre vigilancia del consumo antibiótico (ESAC -European Surveillance of Antimicrobial Consumption-) en el que

evalúan el uso de antibióticos en pacientes no hospitalizados y su asociación con la resistencia antibiótica, concluye que en Europa existe una correlación entre estos dos parámetros. En general, los países del sur y del este de Europa, como Francia (32,2%), tienen un mayor consumo de antibióticos que los países del norte, como Holanda (10%). Según este estudio, el uso estimado de antibióticos en pacientes no hospitalizados en España está en torno al 30% (Goossens, 2005). Asimismo, la proporción de SARM puede variar entre distintos hospitales de un mismo país desde un 5% a un 20% (EARSS, 2003, Tiemersma, 2004). Además de las razones mencionadas para explicar este hecho (muestra poblacional en estudio, tipo y tamaño del hospital, política de control de infección o uso de los antibióticos intrahospitalarios), otros factores a tener en cuenta son la tendencia de SARM a aparecer en forma de brotes de infección intrahospitalaria y la facilidad de algunos de los clones epidémicos para diseminarse a otros centros hospitalarios (Muto, 2003).

Durante los últimos 10 años se ha producido una diseminación del SARM desde los grandes hospitales a otros con menor número de camas y de éstos a instituciones más pequeñas como geriátricos y centros de crónicos, hasta el punto que se ha convertido en una especie endémica en la mayoría de estos centros. Esta endemia de SARM ha sido favorecida por la falta de programas de control de la infección en muchos hospitales (Jarvis, 2003).

3.2. Descripción de clones epidémicos.

Se considera que un clon de SARM es epidémico cuando es capaz de producir brotes hospitalarios en un tiempo corto, en hospitales geográficamente distantes y se mantiene en dichos centros durante un período de varios años. En un amplio estudio llevado a cabo por Oliveira *et al*, publicado en 2001, se pudieron analizar los genotipos de 3067 cepas de SARM aisladas en distintos países, por electroforesis en campo pulsátil (*pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE). De forma complementaria, una selección representativa de cepas fue estudiada de forma pormenorizada por *Multilocus sequence typing* (MLST), análisis del SCCmec y estudio del polimorfismo de la región que codifica la proteína A (*spaA*). La principal conclusión de este trabajo fue que el 68% de los aislamientos podían englobarse en alguno de los cinco clones que estos

autores definieron como pandémicos (Oliveira, 2001). En la tabla 3.1 se muestra la distribución de cepas de este estudio y en la figura 3.2 el genotipo por PFGE de los cinco clones mencionados. Estos clones son los denominados Ibérico (Domínguez, 1994), Brasileño (Aires de Sousa, 1998), Húngaro (De Lencastre, 1997), Nueva York/Japón (Chung, 2000) y Pediátrico (Sa-Leao, 1999) (Figura 3.3).

Tabla 3.1- Origen y distribución clonal de 3067 cepas de SARM. (Modificado de Oliveira, 2001)

PAÍS	Nº Cepas	Ibe	Bra	Hun	NY/Jp	Ped
Sudamérica	720	-	69%	-	-	14%
R. Checa	59	12%	80%	-	-	-
Hungría	285	-	-	67%	-	-
Italia	53	47%	-	-	-	-
Japón	143	-	-	-	76%	-
Polonia	270	10%	-	-	-	32%
Portugal	504	49%	22%	-	-	6%
España	189	83%	-	-	-	-
Uk	13	62%	-	-	-	-
USA	831	14%	-	-	35%	6%
TOTAL	3.067	19%	21%	6%	13%	9%

Ibe: Ibérico; Bra: Brasileño; Hun: Húngaro; NY/Jp: Nueva York/Japón; Ped: Pediátrico

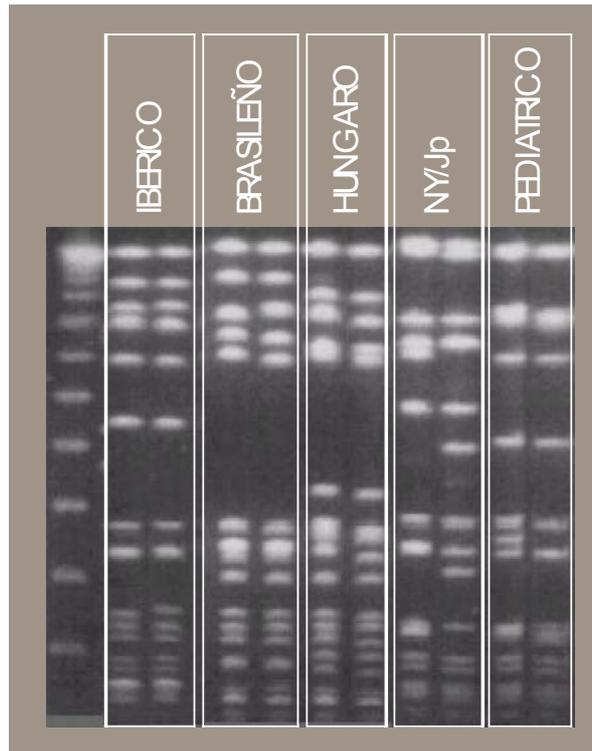


Figura 3.2- Genotipos por PFGE de cinco clones pandémicos: Ibérico, brasileño, húngaro, NY/Japón y pediátrico.



Figura 3.3- Mapa de distribución de 6 clones pandémicos en las diferentes regiones del mundo. Imagen del FEMS Immunology and Medical Microbiology (Aires de Sousa, 2004)

El clon Ibérico se detectó por primera vez en 1989 como responsable de un brote por SARM en el Hospital Universitario de Bellvitge en Barcelona (Domínguez, 1994) y se diseminó a otros países como Francia, Bélgica (Deplano, 2000), Portugal (Sanches, 1995), Escocia, Italia (Mato, 1998), Holanda, Alemania (Witte, 1997), República Checa (Melter, 1999; Melter, 2004), Polonia (Krzyszton-Russjan, 2002), Suecia (Murchan, 2003) y Estados Unidos (Roberts, 1998).

El clon Brasileño fue descrito en 1992 en Brasil (Teixeira, 1995) y se ha extendido a los países de Sud-América como Argentina (Corso, 1998), Uruguay y Chile (Aires de Sousa, 2001), y a países europeos como Portugal (Aires de Sousa, 1998; Oliveira, 1998), República Checa (Melter, 1999), Grecia (Aires de Sousa, 2003), Finlandia, Alemania, Irlanda, Holanda, Polonia, Suecia y el Reino Unido (Enright, 2002). Recientemente también se ha descrito en India (Arakere, 2005).

El clon Húngaro se ha expandido entre los hospitales de este país desde 1993 (De Lencastre, 1997) y recientemente se ha descrito en hospitales de Taiwan, China (Aires de Sousa, 2003) e India (Arakere, 2005).

El clon Nueva York/Japón fue identificado en los hospitales de Nueva York (Roberts, 1998), Nueva Jersey y Pensilvania (Roberts, 2000), en Canadá (Simor, 2002), Florida (Chung, 2004) y en un hospital de Tokio (Aires de Sousa, 2000). También se ha encontrado en Europa, Finlandia, Irlanda y el Reino Unido (Enright, 2002), y más recientemente en México (Velásquez-Meza, 2004).

El clon Pediátrico fue descrito en 1992 en un hospital pediátrico de Portugal (Sa-Leao, 1999) y posteriormente se ha encontrado en Polonia (Leski, 1998), Estado Unidos (Roberts, 1998), Argentina (Corso, 1998), Colombia (Gomes, 2001), Francia, Reino Unido (Enright, 2002) y España (Pérez-Roth, 2004).

Mediante MLST la distribución genética de los clones Ibérico, Brasileño y Húngaro era muy parecida, constituida por variantes que se diferenciaban como máximo en dos *loci*, (denominada MLST tipo "A"). El MLST de los clones Nueva York/Japón y Pediátrico era idéntico entre ellos (denominado MLST tipo "B") y totalmente distinto al MLST tipo "A" (Oliveira, 2001). El SCCmec del clon Ibérico fue tipo I, el de los clones Brasileño y Húngaro tipo III, el del Nueva

York/Japón tipo II, y el del clon Pediátrico tipo IV. Estos resultados ilustrarían dos líneas evolutivas distintas entre los clones más frecuentemente hallados en el mundo (MLST tipos “A” y “B”). A la vez que demuestran que la adquisición del gen *mecA* tuvo lugar en distintos momentos evolutivos y con procedencias distintas (por ejemplo, SCCmec tipo I ó III asociado al mismo MLST tipo “A”).

La caracterización de estos cinco clones pandémicos, además de sus propiedades genéticas, incluía el fenotipo de resistencia antibiótica. A excepción del clon pediátrico resistente exclusivamente a beta-lactámicos y aminoglucósidos, el resto de los clones presentaba resistencia a múltiples grupos antibióticos (Tabla 3.2)

Tabla 3.2- Resistencia que presentan cada uno de los clones a los diferentes antibióticos.

Clones	β -lact	Macról	Tetrac	Aminog	Quinol	Clor	Rif	Glucop	Sxt
Ibérico	R	R	R	R	R	S	R	S	S
Brasileño	R	R	R	R	R	R	R	S	R
Húngaro	R	R	R	R	R	S	R	S	S
NY/Japan	R	R	R	R	R	S	S	S	S
Pediátrico	R	S	S	R	S	S	S	S	S

β -lact: β -lactámicos; Macról: Macrólidos; Tetrac: Tetraciclina; Aminog: Aminoglucósidos; Quinol: Quinolonas; Clor: Cloranfenicol; Rif: Rifampicina; Glucop: Glucopéptidos; Sxt: Cotrimoxazol. R: Resistente; S: Sensible.

Otros clones pandémicos asociados a cepas SARM son el clon EMRSA-15 y EMRSA-16, ambos se caracterizan por ser sensibles a más grupos de antibióticos. En un principio se describieron asociados a brotes hospitalarios del Reino Unido (Cox, 1995; Moore, 2002) y posteriormente se diseminaron a otros países, como Grecia (Aires de Sousa, 2003), Méjico (Aires de Sousa, 2001), Canadá (Simor, 2002), Florida (Chung, 2004), Finlandia (Salmenlinna, 2002), y a países europeos como Bélgica, Suecia, Dinamarca y España (Enright, 2002; Murchan, 2003; Pérez-Roth, 2003) (Figura 3.2).

3.3. Datos en España

Desde el inicio del uso de la meticilina en la práctica clínica hasta nuestros días cabe destacar dos hechos epidemiológicos en relación a SARM en España. El primero tiene lugar en San Sebastián durante los años 1977-

1979 en los que se produce un importante brote hospitalario, que afectó sobre todo a la unidad de neonatología (Pérez Trallero, 1981; Pérez Trallero, 1988). El segundo hecho, consiste en una onda epidémica de mayor alcance que se produce en los años 1988-1989 y va a constituir un importante problema nosocomial en los hospitales españoles de Madrid, Barcelona y Valencia (Bouza, 1988; De la Torre, 1990; Vindel, 1992; Pujol, 1994). Estos brotes iniciales dieron luego paso a otros en seis comunidades autónomas más. Todos ellos presentaban unas características comunes: ocurrieron en hospitales con más de 500 camas, tuvieron un número elevado de casos de SARM, la mayoría fueron brotes nosocomiales originados en la UCI, estuvieron causados por un clon predominante y su caso índice fue un paciente procedente de otro centro.

Entre 1989-1995 la mayoría de los brotes hospitalarios originados por SARM estaban producidos por el clon Ibérico, detectado por primera vez en el Hospital Universitario de Bellvitge de Barcelona (Domínguez, 1994). Estudios posteriores reflejan que las cepas multirresistentes del clon ibérico han ido disminuyendo siendo sustituidas por otras cepas SARM sensibles a más antibióticos.

La prevalencia de SARM en los hospitales españoles ha seguido un curso ascendente y así lo refieren los datos recogidos en diversos estudios entre los que se encuentra el Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España (EPINE). Durante el período 1990-1999 se observó que la tasa de infecciones por SARM en los hospitales se había incrementado de forma continua pasando de cifras del 4,7% en 1990 a cifras del 40% en 1999 (Asensio, 2002).

El Grupo Español para el Estudio de Estafilococos ha publicado hasta el momento cinco trabajos en los que se refleja la tendencia de éste patógeno en los hospitales españoles durante el período 1986-2002 (Bouza, 1988; Rodríguez, 1992; Díaz, 1994; Cercenado, 1997; Cuevas, 2004). La resistencia a metilina en *S. aureus* ha pasado de ser 1,5% en 1986 a 31,2% en 2002. Este aumento se ha acompañado de un aumento progresivo del porcentaje de resistencia a otros antibióticos como macrólidos, lincosamidas, aminoglicósidos y quinolonas durante el período 1986-2002, como se expone en la tabla 3.3.

Tabla 3.3- Porcentaje de resistencia antibiótica de *S. aureus* en España durante el período 1986-2002.

Antibiótico	% de Resistencia por años				
	1986	1991	1994	1996	2002
Penicilina	94,9	97,1	92,3	92,1	89,3
Oxacilina	1,5	11,2	16,6	17,9	31,2
Eritromicina	7	24,5	33,9	24,2	31,7
Clindamicina	0	6,4	20,6	18,7	20,1
Gentamicina	5,2	14,1	19,3	16,4	16,9
Rifampicina	1,1	4,9	8,7	7	1,8
Cotrimoxazol	ND ^a	ND	0,5	1,1	2,1
Cloranfenicol	5,2	2	18,9	1,2	2,5
Ciprofloxacino	0,6	16,6	20,6	19,9	33,9
Vancomicina	0	0	0	0	0
Teicoplanina	0	0	0	0	0
Linezolid	ND	ND	ND	ND	0
Q/D ^b	ND	ND	ND	ND	0

^a ND, no determinado

^b Q/D, quinupristina/dalfopristina

Un estudio realizado en el año 2000 en 31 hospitales españoles en pacientes con bacteriemia ha mostrado un porcentaje de resistencia a oxacilina de 28% (Oteo, 2002). Posteriormente, este estudio fue ampliado a 40 hospitales españoles participantes en el Grupo EARSS durante el período 2000-2002 mostrando una tasa de resistencia a oxacilina de 24,5% (Oteo, 2004).

El proyecto de estudio VIRA (Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos) creado en el año 2001 con la finalidad de realizar seguimientos periódicos epidemiológicos de la resistencia a antibióticos en España, al analizar los datos obtenidos durante el mes de estudio del año 2004 refieren que la incidencia global de resistencia a meticilina en *S. aureus* fue del 31,2%, lo que supone un aumento significativo comparado con la tasa del año 2001 (24,8%). También evidencia la multiresistencia en los aislamientos de SARM ya que casi la mitad de las cepas fueron resistentes a tres antibióticos (Picazo, 2004).

En la tabla 3.4 se reflejan los datos de SARM en España proporcionados por el estudio EARSS durante el período 2000-2004, en la cual observamos un ligero aumento de SARM en estos últimos años.

Tabla 3.4- Proporción de SARM en aislados de hemocultivos durante el período 2000-2004. Datos obtenidos del informe anual EARSS 2004. www.earss.rivm.nl.

	2000	2001	2002	2003	2004
SARM	28%	23%	23%	24%	26%

Al igual que lo descrito en estudios europeos, diferentes trabajos epidemiológicos realizados en hospitales españoles reflejan que la adquisición de SARM nosocomial es favorecida por el aumento de la estancia hospitalaria y por el consumo excesivo de antibióticos, siendo la UCI, cirugía general y digestiva y medicina interna las unidades de hospitalización donde el SARM es más frecuente (Montesinos, 2003; Chaves, 2005).

Durante los últimos años, se han producido cambios importantes en la epidemiología del SARM, entre los que cabe destacar el aumento de las cepas de SARM sensibles a un mayor número de grupos antibióticos (cepas que no pertenecen a los clones pandémicos multirresistentes), el impacto clínico y terapéutico de la aparición de cepas SARM con sensibilidad disminuida a glucopéptidos, y, por último, la aparición de los primeros casos de SARM de adquisición comunitaria.

4. Epidemiología de las infecciones por SARM en la comunidad

A lo largo de los años la epidemiología de las infecciones por SARM ha experimentado una serie de cambios tanto en su presentación clínica como en sus características microbiológicas. En el pasado, la gran mayoría de las infecciones por SARM se adquirían en hospitales grandes y ocurrían en pacientes con factores de riesgo que favorecían la colonización ó infección por SARM, como son un consumo elevado de antibióticos, estancia hospitalaria prolongada (generalmente mayor de 10 días), sobre todo en unidades de cuidados intensivos, edad avanzada, cirugía previa, procedimientos invasivos (catéteres intravenosos, sondas urinarias, traqueostomías), úlceras de decúbito, enfermedades subyacentes graves y contacto con pacientes colonizados por SARM (Thompson, 1982). En la actualidad el reservorio de SARM no sólo se localiza en los hospitales sino que también se encuentra en instituciones extrahospitalarias (sociales y sanitarias), en centros de pacientes crónicos ó en centros de cuidados paliativos. En estos centros de larga estancia tienen un mayor riesgo de adquirir SARM los residentes que presentan úlceras cutáneas, una mayor dependencia funcional (encamados, incontinentes) o han estado previamente hospitalizados (Bradley, 1999). Generalmente estas personas con SARM están colonizadas de forma prolongada, sobre todo en úlceras crónicas y/o ser portadores nasales (Mulhaussen, 1996); a diferencia de las infecciones, que son poco frecuentes, de carácter leve y se localizan habitualmente en partes blandas (Bradley, 1991).

Estos hechos implican modificaciones en la epidemiología de las infecciones por SARM y suponen un riesgo de diseminación de SARM a la comunidad (Chambers, 2001).

La mayoría de los casos de infección por SARM que se identifican en la comunidad, están relacionados con una reciente hospitalización (en los 4 meses previos), con tratamiento antibiótico previo ó con un contacto con personas que han estado hospitalizadas recientemente (L'Heriteau, 1999; Jones, 2002).

En los últimos años se han publicado casos de infección comunitaria asociada a la ingesta de alimentos (Jones, 2002; Kitai, 2005) y de transmisión

de SARM entre animales y humanos; los perros y animales domésticos que viven en contacto cerrado con personas portadoras de SARM pueden llegar a colonizarse por SARM (van Duijkeren, 2004).

Los portadores nasales de *S. aureus* también juegan un papel importante en la epidemiología y patogénesis de la enfermedad por SARM pudiendo actuar como reservorios de SARM comunitario. Así por ejemplo, un estudio realizado de abril a septiembre de 2002 en San Francisco, en el que analizaron la colonización nasal por *S. aureus* en jóvenes sin hogar y fugitivos, concluyeron que los portadores nasales de SARM en la comunidad habían aumentado, siendo este mismo subgrupo de individuos los que tenían un riesgo más alto de infección por SARM comunitario. Estos individuos constituyen el reservorio de SARM adquirido en la comunidad, y son principalmente individuos con infección por VIH, ADVP, pacientes con abscesos y aquellos que tienen una historia de reciente hospitalización (Pan, 2005). Un informe reciente de salud nacional y examen de nutrición realizado en Washington a 9662 individuos, informó que el 0,8% de la población general era portadora de SARM, y que sólo el 0,4% de la población general era portadora de SARM con SCCmec tipo IV, marcador de las cepas de SARM comunitario (Jernigan, 2004).

El primer brote de SARM adquirido en la comunidad se describió en Detroit en 1980-81, y se caracterizó porque más de la mitad de los pacientes afectados eran consumidores de drogas por vía parenteral. Aunque el origen de este brote no se pudo identificar, se cree que el uso compartido de jeringuillas pudo ser la causa de la transmisión cruzada de SARM (Saravolat, 1982).

En los EEUU las primeras cepas de SARM adquirido en la comunidad aparecen a finales de 1990s, publicándose casos de colonización y/o infección por SARM en niños no relacionados con el ámbito sanitario y sin los factores de riesgo típicos asociados a la colonización por SARM (Herold 1998; Gross-Schulman, 1998). La muerte de cuatro niños en Minnesota y Norte de Dakota causada por cepas de SARM comunitario (CDC, 1999) indican el peligro potencial que supone la presencia de SARM en la comunidad y la alta virulencia que poseen estas cepas.

Desde el primer caso descrito de SARM comunitario (SARM-CO) hasta nuestros días, son muchas las publicaciones que se encuentran en la literatura y que hacen referencia a infecciones por SARM adquirido en la comunidad en diferentes ciudades de EEUU (Suggs, 1999; CDC, 2003; Fey, 2003; Baggett, 2003; Shukla, 2004; Kaplan, 2005) y en otras partes del mundo como Australia (Rings Ferry, 1998; Turnidge, 2000), Nueva Zelanda (Stacey, 1998), Canadá (Embil, 1994), Reino Unido (Detrich, 2004), Francia (Dufour, 2002), Japón (Fang, 2004), Alemania (Witte, 2004), Brasil (Ribeiro, 2005), Holanda (Wannet, 2004).

En países como Dinamarca, donde la prevalencia de infección por SARM es baja, se han descrito casos de SARM-CO en el que los pacientes presentaban infecciones de piel y partes blandas; factores de riesgo que no están presentes en los brotes de SARM hospitalario (Faria, 2005).

En nuestro país los últimos trabajos del Grupo de estudio de estafilococos reflejan un aumento de SARM de probable origen comunitario que varía desde el 5% en el año 86 al 17,8% en el 2002 (Cuevas, 2004); la mayoría de los datos disponibles proceden de estudios hospitalarios, que informan tasas muy variables sobre los casos de SARM. Todavía no se han realizado en España estudios de infecciones de SARM en la comunidad ni de los posibles factores de riesgo relacionados con la colonización por SARM en la comunidad.

Los brotes causados por SARM asociado a la comunidad no sólo afectan a poblaciones relativamente cerradas, como cárceles (CDC, 2003), cuarteles (Zinderman, 2004; Campbell, 2004), guarderías, sino que también es causante de brotes en equipos de atletas, sobre todo en deportes donde se produce un contacto directo de piel entre los deportistas (CDC, 2003; Karakova, 2005; Cohen, 2005). También se han publicado datos que afirman un aumento de la colonización por SARM entre miembros de “poblaciones cerradas” como son las comunidades de los aborígenes de Australia (Udo, 1993) y los indios de América (Groom, 2001). Esta alta tasa de SARM-CO puede estar asociada con factores de riesgo difundidos en la comunidad como son el aumento de las infecciones de piel, el hacinamiento y el uso de antibióticos de amplio espectro (Maguire, 1998).

Aunque varios estudios refieren una alta prevalencia de SARM comunitario (SARM-CO), un análisis que examina los resultados de 57 estudios sobre la prevalencia de SARM-CO entre pacientes hospitalizados o entre individuos de la comunidad, sugiere que la prevalencia de SARM en la comunidad en pacientes sin factores de riesgo sigue siendo baja ($\leq 0,24\%$) (Salgado, 2003).

Se han descrito casos de bacteriemia y síndrome de shock séptico por cepas de SARM-CO en UCI neonatal destacando el hecho de que los microorganismos comunitarios pueden llegar a ser serios patógenos nosocomiales (Healy, 2004).

Los síndromes clínicos causados por las cepas de SARM-CO (Mongkolrattanothai, 2003) varían desde infecciones de piel y partes blandas (Frazee, 2004; Moran, 2005), hasta casos severos de neumonía necrotizante (Naimi, 2003; Francis, 2005), fascitis necrotizante (Miller, 2005), tromboflebitis séptica y sepsis.

La gran morbilidad observada en algunas de las infecciones por SARM adquiridas en la comunidad (Baba, 2002; Fey, 2003) puede haberse debido a la utilización de β -lactámicos como tratamiento inicial y la presencia de genes de virulencia como la Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV) (Dufour, 2002).

La LPV, descrita en 1932 por Pantón y Valentine (Pantón-Valentine, 1932), juega un papel determinante dentro de las afecciones producidas por SARM en la comunidad (Diep, 2004) y se encuentra en el 77% de los aislamientos (Naimi, 2003). Habitualmente esta toxina está presente en $<5\%$ de *S. aureus* y se asocia a procesos inflamatorios de piel y partes blandas y neumonía necrotizante (Lina, 1999).

Las infecciones asociadas a la LPV (neumonía necrotizante, forunculosis) son debidas a cepas que pertenecen a diferentes líneas genéticas. La LPV tiene actividad leucocitotóxica y dermonecrótica debida a la presencia de dos componentes, uno de clase S y otro de clase F, que están codificados por dos genes, *lukS-PV* y *lukF-PV* (Prevost, 1995), los cuales se transmiten mediante un fago.

Debido a la capacidad invasiva y virulenta que posee esta toxina, ha creado una gran importancia y preocupación en la sociedad, por lo que se están realizando numerosos estudios en diferentes países, sobre aislamientos

de SARM con capacidad para producir la Leucodinina de Panton-Valentine (Wannet, 2004; Miklasevics, 2004; Liassine, 2004; Maier, 2005; Witte, 2005; Robert, 2005).

Hasta el momento la LPV sólo se ha asociado con el SCCmec tipo IV y en menor frecuencia con el tipo V, pero en un país de Suecia han encontrado algunos aislamientos de SARM que son un nuevo subtipo de SCCmec tipo IV y que poseen la LPV positiva, pudiendo ser un nuevo clon de diseminación en la comunidad (Berglund, 2005).

Un estudio reciente de Saïd-Salim *et al.* demuestra que la presencia y expresión de los genes que codifican la LPV no se encuentran de manera uniforme entre las cepas de SARM-CO, por lo que sugieren que factores adicionales están involucrados en la leucotoxicidad y patogénesis del SARM-CO (Saïd-Salim, 2005).

Otros genes que tienen relación con el SARM-CO son los genes que codifican la resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas debido a su presencia variable en las cepas SARM, lo que ha permitido usar la sensibilidad a clindamicina como un marcador de cepas SARM adquiridas en la comunidad. Los tipos SCCmec IV y V, encontrados en aislamientos de SARM-CO, no contienen el Tn554 o *erm* por lo que muchas de estas cepas son sensibles a eritromicina y clindamicina. No obstante, el gen *erm* puede estar presente en un plásmido ó en otra parte del genoma bacteriano. También es posible que el gen *msrA* u otros genes que confieren resistencia a macrólidos puedan encontrarse en cepas de SARM-CO (Crawford, 2005).

Diferencias entre SARM-CO y SARM hospitalario:

- El SARM-CO afecta generalmente a niños y adultos jóvenes sin factores de riesgo.

- Hasta el momento los aislamientos de SARM descritos en pacientes de la comunidad se caracterizan por ser sensibles a múltiples antibióticos y generalmente sólo son resistentes a β -lactámicos, con una CMI a oxacilina baja; a diferencia de los aislamientos hospitalarios de SARM que presentan resistencia múltiple a varios grupos de antibióticos no relacionados.

- Las cepas de SARM-CO parece ser que crecen más rápido in vitro (Okuma, 2002) y llevan genes de virulencia adicionales (Baba, 2002).

- Los aislamientos de SARM-CO se caracterizan por poseer el SCCmec tipo IV y en menor frecuencia el V (Ito, 2004), y los genes de la toxina LPV (Vandenesch, 2003); las cepas SARM de origen hospitalario poseen el SCCmec tipo II o III, en algún caso también se ha aislado la LPV (Saiman, 2003).

Estudios recientes han descrito similitudes entre el SARM-CO y aislamientos esporádicos de SARM nosocomial, ambos son genéticamente diversos, tienen SCCmec tipo IV, pueden contener los genes de la LPV y son sensibles a mayor número de antibióticos. Estos datos reflejan una mayor posibilidad de que cepas de SARM descritas como adquiridas en la comunidad, sean realmente originadas en los hospitales (Aires de Sousa, 2003).

Se han descrito diferentes definiciones para clasificar las infecciones por SARM en comunitarias y nosocomiales (Salgado, 2003), sin llegar a una definición estándar, de ahí que sea necesario disponer de marcadores moleculares de las cepas de SARM. Así Enright et al propusieron un nuevo método de tipaje basado en la combinación de los perfiles por MLST y el tipo de SCCmec (Enright, 2002), lo que permite caracterizar mejor las diferentes cepas y los tipos clonales.

5. Tipificación molecular de microorganismos

5.1. Fundamentos y aplicaciones de los sistemas de tipificación molecular en bacteriología.

Los sistemas de tipificación molecular constituyen una de las aportaciones microbiológicas que más difusión han tenido en los últimos años. Estos sistemas comprenden una gran variedad de técnicas que tienen como objeto comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos. De este modo, se puede reconocer la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente y, por tanto, derivados recientes de un microorganismo precursor común. A la vez, deben ser técnicas capaces de diferenciar aislamientos no relacionados, con independencia de su pertenencia a la misma especie microbiológica o taxón (Maslow 1993; Maslow, 1996; Soll, 2003). Con anterioridad estos estudios se basaban en las características fenotípicas de los microorganismos (propiedades antigénicas, metabólicas o de resistencia antibiótica). Sin embargo, muchos de estos sistemas fenotípicos son limitados para establecer diferencias o similitudes concluyentes entre microorganismos.

Las técnicas moleculares que analizan propiedades o polimorfismos genéticos en los microorganismos, han ampliado notablemente el campo de la tipificación en microbiología. Los fundamentos de estas técnicas son variables: estudios de restricción del ADN cromosómico o extracromosómico, análisis del número de copias de determinadas secuencias de inserción o repetitivas a lo largo del cromosoma o de las regiones entre secuencias de inserción o repetitivas adyacentes (REP-PCR; polimorfismo IS6110 en *Mycobacterium tuberculosis*) o amplificación arbitraria de fragmentos genéticos (AP-PCR). La mayor ventaja de estos métodos radica en la estabilidad de los marcadores genéticos utilizados y en la posibilidad de aplicarlos universalmente a distintos géneros y especies de microorganismos (Domínguez, 2005).

Los marcadores moleculares se han aplicado a diferentes campos y su disponibilidad ha mejorado nuestro conocimiento sobre:

- Patogénesis e historia natural de ciertas infecciones,
- Detección de brotes y epidemias, identificación de reservorios y de mecanismos de transmisión de patógenos,

- Diseño de medidas de control de propagación de la infección,
- Evolución genética de poblaciones microbianas,

En todas estas aplicaciones el objetivo de los marcadores moleculares es el de definir la relación existente, clonal o no, entre los aislamientos estudiados. El término *clon* o *grupo clonal* en epidemiología hace referencia al grupo de aislamientos relacionados por el hecho de descender de un ancestro común, esto es, por formar parte de una cadena de replicación y transmisión. Las cepas relacionadas provienen, pues, de la expansión clonal de un precursor único y poseen un nivel de similitud entre sus genotipos y fenotipos significativamente superior al que se encontraría entre aislamientos no relacionados de la misma especie seleccionados arbitrariamente (Soll, 2003; Coll, 2006).

Merece también especial mención, la diseminación horizontal entre bacterias (del mismo o distinto taxón) de plásmidos o elementos genéticos potencialmente móviles (transposones, integrones, fagos...) que contengan secuencias relevantes epidemiológicamente, como por ejemplo, genes de resistencia antibiótica o de virulencia.

La aplicación de técnicas y marcadores de epidemiología molecular es indispensable en el estudio de la infección nosocomial, sobre todo en hospitales en los que se dispone de unidades de vigilancia intensiva, neonatología, quemados, hematología u oncología, en donde ingresan pacientes susceptibles de adquirir infecciones graves intrahospitalarias. Asimismo, existen numerosas referencias relacionadas con la aplicación de marcadores moleculares al estudio de las infecciones extrahospitalarias, son algunos ejemplos los estudios de patrones de transmisión de tuberculosis, la identificación de reservorios de legionelosis y los estudios epidemiológicos de infección por neumococo o meningococo (Dominguez, 2005).

Los métodos moleculares aplicados al estudio epidemiológico pueden estructurarse en los siguientes apartados: 1) Análisis de ADN extracromosómico, 2) Restricción de ADN cromosómico y detección de secuencias por hibridación con sondas, 3) Macrorrestricción de ADN cromosómico, 4) Amplificación de secuencias genéticas con o sin restricción posterior del producto obtenido, 5) Análisis de ADN por secuenciación y 6) Perfil de hibridación de múltiples secuencias (Soll, 2003; Coll, 2006). La

elección de la técnica a aplicar dependerá de la capacidad técnica y tecnológica de cada laboratorio, de la situación epidemiológica específica a estudiar y de la rapidez necesaria en la respuesta del laboratorio (Van Belkum, 2001). La macrorrestricción de ADN cromosómico, incluye la técnica de PFGE, siendo una de las más utilizadas ya que presenta gran versatilidad y permite conocer la clonalidad de diferentes aislados en situaciones epidémicas con tiempo y espacio definido. Como alternativa se encuentran las técnicas de amplificación (técnicas de PCR), de mayor rapidez que el PFGE, que ofrecen ventajas similares al PFGE en situaciones de epidemia (Welsh, 1990; Williams, 1990), y el análisis por secuenciación que ofrece ventajas en estudios de grandes grupos clonales pero de escasa utilidad en la caracterización de epidemias por lo que se utilizan para el análisis y comparación de aislados de diferentes áreas geográficas y su evolución en el tiempo (Enright, 1999).

Durante los últimos años se han venido desarrollando múltiples técnicas de tipificación para caracterizar el SARM, pero a día de hoy no hay un consenso en el método óptimo que permita intercambio de datos entre laboratorios, ya que cada técnica tiene ventajas e inconvenientes. Algunos investigadores prefieren como método de referencia la técnica de PFGE por ser el método disponible más discriminativo para estudios de brotes originados en un período de tiempo corto (Struelens, 1992; Back, 1993; Van Belkum, 1998; McDougal, 2003).

A continuación se exponen los fundamentos de algunos de los métodos moleculares que más se han utilizado para estudios epidemiológicos en SARM, concretamente de PFGE y de MLST.

5.2. Macrorrestricción de DNA y electroforesis en campo pulsante.

Para una especie bacteriana concreta, podemos encontrar enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, es decir, enzimas cuyo lugar de restricción, por su longitud y secuencia, se encuentran raramente a lo largo del ADN cromosómico de la especie bacteriana en cuestión (Goering, 1993). El uso de este tipo de enzimas permite la macrorrestricción del ADN de la bacteria, es decir, la división del ADN en pocos fragmentos (entre 10 y 30). Muchos de estos fragmentos son de gran tamaño, más de 40 kb, y no pueden separarse

por técnicas de electroforesis convencional, en las que se aplica un campo eléctrico constante ó estático, sino que requieren técnicas en las que la orientación del campo eléctrico es variable periódicamente, son las denominadas técnicas de electroforesis en campo pulsante o *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE).

La combinación de estas dos técnicas, macrorrestricción del ADN y separación de los fragmentos por PFGE, se ha aplicado con mucha frecuencia en estudios epidemiológicos en bacteriología. Se obtienen así, patrones de restricción sencillos que representan el ADN cromosómico bacteriano distribuido en unas pocas bandas con movilidades electroforéticas distintas. Sin embargo, las características de estas técnicas determinan una serie de cambios a tener en cuenta en las distintas fases en las que se divide el proceso de macrorrestricción y PFGE: 1) el procedimiento de extracción de ADN, obliga a inmovilizar las células bacterianas en bloques de agarosa, en los que se llevará a cabo la lisis, de manera que el ADN cromosómico también quede embebido en agarosa, el objetivo es que el ADN permanezca íntegro y no se fracture accidentalmente (al pipetear, agitar ...) lo cual desvirtuaría los patrones de restricción y afectaría a la reproducibilidad de la técnica, 2) la restricción del ADN debe hacerse tal y como éste está preparado, es decir, inmovilizado en los bloques de agarosa, utilizando enzimas de baja frecuencia de corte, y 3) la técnica de electroforesis utilizada para la separación de fragmentos debe ser una PFGE, con las características diferenciales propias de ésta.

5.2.1. Fundamentos y variantes técnicas.

En 1984 Schwartz y Cantor demuestran que la orientación periódica del campo eléctrico permite separar las moléculas grandes de DNA (Schwartz, 1984), resolviendo así el problema de migración de estas moléculas a través de los poros de agarosa cuando se las sometía a electroforesis de campo constante y unidireccional donde los fragmentos con tamaño superior a 50Kb coemigraban como una única banda haciendo difícil la interpretación del patrón de bandas.

Durante los años 70, se observó que las moléculas de DNA bajo la acción de un campo eléctrico se reorientaban y se desplegaban avanzando en dirección al polo positivo. Basándose en esto, el principio de la técnica de ECP

descrita por Schwartz consiste en que, cuando se aplica un campo eléctrico, las moléculas de DNA migran en dirección paralela al campo, a través de los poros de agarosa del gel. Si se aplica un segundo campo eléctrico con una dirección distinta, las moléculas de DNA tienen que cambiar su conformación y reorientarse, antes de migrar en la dirección del segundo campo. El tiempo necesario para llevar a cabo la reorientación, está en relación con la longitud de la molécula ó peso molecular, por lo tanto, cuanto mayor sea el fragmento, más tiempo necesita para reorientarse, debido a la barrera física que supone la matriz de agarosa y menos tiempo migrará a través del gel en la nueva dirección. A medida que los intervalos de los campos van cambiando en función de la intensidad y del voltaje, las moléculas de DNA van migrando a lo largo del gel en forma de línea recta, obteniéndose al final un patrón de separación de los fragmentos que refleja la suma de todos los intervalos de campos que se han aplicado (Birren, 1993).

Se han diseñado distintos aparatos de electroforesis en campo pulsátil (electroforesis en campo alterno ortogonal, electroforesis en campo invertido, electroforesis en campo transversal, electroforesis en gel rotante, etc), todos tienen en común la capacidad de separar moléculas de DNA de gran tamaño, aunque difieren en la velocidad de separación y en la resolución obtenida. De todos los sistemas desarrollados hasta el momento, el que tiene un uso más extendido es el CHEF (*clamped homogeneous electric field electrophoresis*). Tiene como ventajas la facilidad de manejo y la capacidad de generar patrones de bandas rectos que hacen más fácil la comparación entre ellos.

Las técnicas de PFGE normalmente requieren voltajes elevados durante muchas horas, lo cual hace necesaria la recirculación y refrigeración del tampón de electroforesis. Así los cuatro componentes básicos de un sistema de PFGE son los siguientes:

i) unidad de control de pulsos-generador de corriente; ii) cubeta de electroforesis, es una cubeta acrílica en la que se encuentran los 24 electrodos distribuidos en forma hexagonal y en cuyo centro se coloca el gel de agarosa, sumergido en el tampón de electroforesis correspondiente; iii) bomba de recirculación del tampón, la recirculación del tampón de electroforesis es esencial por dos motivos: 1) para refrigerar y mantener una temperatura constante en la cubeta y en toda la superficie del gel y 2) para mantener la

capacidad de tampón de la solución, alterada por el proceso de electrolisis; iv) unidad de refrigeración, la refrigeración del tampón de electroforesis permite mantener constante la temperatura de la cubeta, utilizar voltajes superiores y por tanto electroforesis más rápidas.

5.2.2. Variables que afectan a la resolución del PFGE.

Los resultados de las técnicas de PFGE son muy sensibles a variaciones en prácticamente todos los parámetros electroforéticos. Las condiciones para obtener la mejor resolución por PFGE están, por supuesto, en función del rango de tamaño de las moléculas a separar y del enzima de restricción seleccionado, pero también intervienen variables técnicas como la duración y alternancia de los pulsos eléctricos, el voltaje, la temperatura de la cubeta, el tiempo de electroforesis, el tampón utilizado o el ángulo de reorientación.

Pulsos: duración y alternancia. Los sistemas de PFGE consiguen separar fragmentos grandes de ADN al inducir la reorientación de las moléculas mediante cambios periódicos en el campo eléctrico. La duración de los campos eléctricos que se alternan determina el tamaño del ADN que puede separarse. Así pues, denominamos *pulso* al campo eléctrico alternante, y su *duración* o *intervalo* hace referencia a cuánto tiempo está actuando en una dirección u otra. Los pulsos pueden durar fracciones de segundo, para separar moléculas de pocas kb, o pueden durar algo más de una hora para separar moléculas mayores de 5 Mb. En general, cuanto mayor es la molécula de ADN, mayor tiempo de reorientación se requiere; las moléculas pequeñas, que pueden reorientarse con rapidez invierten gran parte del tiempo del intervalo de pulso en avanzar a lo largo del gel. Como habitualmente interesa separar un rango amplio de fragmentos de ADN con distintos tamaños, los sistemas de PFGE, permiten establecer un incremento progresivo en la duración de los pulsos a lo largo de la duración total de la electroforesis. Los sistemas comerciales de PFGE más utilizados actualmente, establecen una distribución lineal de la duración de los pulsos durante el tiempo de electroforesis.

Voltaje. El gradiente de voltaje es la diferencia entre el potencial eléctrico de los electrodos, este valor representa la fuerza que conduce el ADN a través del gel. Por tanto, el gradiente de voltaje debe expresarse en unidades de voltaje por distancia. Por ejemplo, si la fuente de electroforesis genera un

voltaje de 180 V a una cubeta en la que los electrodos están separados 30 cm, el gradiente de voltaje será de 6 V/cm. El tamaño del gel utilizado no modifica este parámetro, siempre que la distancia entre los electrodos o el voltaje aplicado no varíe. El uso de distintos voltajes afecta no sólo la distancia de migración sino también el rango de tamaños que pueden separarse. Así, para obtener una resolución comparable en geles procesados a diferentes voltajes, debe modificarse no sólo el tiempo de electroforesis, sino los intervalos de pulsos para compensar las diferencias en la migración de ADN. Utilizar un voltaje inferior requiere intervalos de pulso más largos para obtener resultados similares. A voltajes bajos, las moléculas de ADN requieren más tiempo para reorientarse y avanzar tras la alternancia del pulso eléctrico.

Temperatura de electroforesis. Como se ha mencionado previamente, la recirculación del tampón de electroforesis y el mantenimiento de una temperatura constante son condiciones indispensables para obtener resultados reproducibles. Temperaturas entre 12°C y 15°C son las más habituales. A medida que la temperatura aumenta, el ADN avanza más rápido pero disminuye la resolución de las bandas en el gel.

Tiempo de electroforesis. Debe intentarse mantener el tiempo mínimo de electroforesis necesario para obtener una resolución adecuada. En electroforesis largas la presencia de nucleasas residuales puede contribuir a la degradación del ADN, además, las bandas pierden definición en la zona más distal del gel.

Tampón de electroforesis. De la composición de éste depende la intensidad de la corriente eléctrica.

Ángulo de reorientación. Como se ha mencionado, por ángulo de reorientación, se entiende el ángulo que forman los vectores correspondientes a los dos campos eléctricos que se alternan. Para obtener una resolución adecuada por PFGE se requieren ángulos de reorientación de más de 90°.

5.2.3. Criterios para la interpretación de resultados.

El objetivo final de las técnicas de tipificación molecular aplicadas al análisis de brotes de infección, es el poner de manifiesto que los aislamientos relacionados epidemiológicamente, lo están también genéticamente. Es imprescindible conocer los fundamentos de las técnicas de PFGE y cómo

ciertos cambios genéticos pueden alterar los patrones de bandas obtenidos por PFGE, para interpretar correctamente los resultados. En una situación ideal, los patrones de PFGE de los aislamientos que representan una cepa epidémica deberían ser idénticos y fácilmente diferenciables de los aislamientos epidemiológicamente no relacionados. Sin embargo, con frecuencia cambios genéticos, que ocurren muchas veces de forma aleatoria, alteran el perfil de los patrones de la cepa epidémica en el curso de un brote.

A la hora de interpretar los patrones de PFGE, debe examinarse la colección completa de cepas a estudiar en busca de un patrón epidémico, que sería el más común entre los aislamientos. A continuación todos los otros patrones deben compararse con éste y a la vez entre sí. Es preciso contabilizar el número de fragmentos distintos de cada cepa con todas las demás, fragmento a fragmento (Tenover, 1995). En función del número de diferencias entre dos patrones clasificaremos a los aislamientos en:

Idénticos: cuando los dos aislamientos presentan el mismo número de bandas y éstas tienen aparentemente el mismo tamaño. En este caso ambos aislamientos representan la misma cepa.

Genéticamente relacionados: cuando el número de diferencias entre los dos aislamientos sea inferior o igual a 3. Esto es debido a que un único cambio genético, en el más desfavorable de los casos (mutación espontánea que afecte a un lugar de restricción: creando uno nuevo o haciendo desaparecer uno ya existente), se traduce en un máximo de tres diferencias entre los patrones de un aislamiento y su ancestro. En este caso, las dos cepas pueden considerarse genéticamente relacionadas (una subtipo de la otra o ambas derivadas de un ancestro común) y sus diferencias pueden ser la consecuencia de los cambios genéticos que se acumulan en las sucesivas generaciones bacterianas.

Posiblemente relacionados: cuando los cambios entre los dos patrones pueden ser atribuidos a dos hechos genéticos independientes, el número de cambios puede llegar a ser hasta de 6 (inserciones o deleciones de ADN; o ganancia o pérdida de lugares de restricción). Aunque estos aislamientos puedan también corresponder a una línea evolutiva común, su relación genética no es tan cercana y por tanto, es menos probable su relación epidemiológica.

No relacionados: Cuando los cambios entre los dos patrones son atribuibles a tres o más cambios genéticos independientes, lo cual se traduce en un número de diferencias entre los dos patrones superior a 6. En este caso interpretaremos que las dos cepas pertenecen a clones distintos, sin relación epidemiológica.

5.2.4. Indicaciones e inconvenientes de la técnica.

Las técnicas de macrorrestricción y PFGE se han utilizado para la tipificación molecular de un gran número de especies bacterianas. Son técnicas que exploran la organización del ADN cromosómico bacteriano bajo la acción de la digestión por un enzima, por tanto dan información general sobre el genotipo bacteriano y sus cambios más recientes. En general, sus resultados han demostrado ser suficientemente discriminativos, con excelente reproducibilidad y fáciles de interpretar cuando se estudian colecciones de microorganismos aisladas en un periodo de tiempo corto (Tenover, 1994).

Las técnicas de macrorrestricción y PFGE son de utilidad en la mayoría de especies bacterianas, sin embargo en algún caso carecen del suficiente poder de discriminación (Guallar, 2004). Por esta razón, al emplear la técnica sobre alguna especie sobre la que no hay experiencia previa, es necesario elegir cuidadosamente las cepas que utilizaremos como controles (aislamientos no relacionados epidemiológicamente con las cepas a estudiar).

Un inconveniente importante es el derivado de la interpretación de los patrones de bandas obtenidos, que es subjetiva en la mayoría de los casos, y de la ausencia de un sistema normalizado que permita cuantificar uniformemente la distancia genética (Enright, 2000). En un intento por mejorar la reproducibilidad y comparación de resultados, varios grupos consensuaron una estandarización del método (Mulvey, 2001; Murchan, 2003). Otro de sus inconvenientes es que requiere un equipo especializado relativamente caro y que es una técnica laboriosa que dura 2-3 días (Arbeit, 1995).

Finalmente, debe recordarse que las técnicas de macrorrestricción y PFGE no detectan cambios puntuales en genes ni permiten la observación detallada de ciertos elementos genéticos (plásmidos, transposones, secuencias de inserción, etc.). Por tanto, para abordar algunos problemas epidemiológicos

en los que intervengan estas secuencias, se requiere la combinación con otras técnicas.

5.3. Análisis del ADN por secuenciación: *Multilocus Sequence Typing (MLST)* .

El MLST es una técnica desarrollada y diseñada para identificar clones y/o líneas clonales, fundamentalmente en poblaciones bacterianas. Es un marcador molecular de aplicación en epidemiología global o a largo plazo (identificación de grupos poblacionales con independencia de pequeñas variaciones que puedan surgir geográfica y/o temporalmente), aunque ha sido ocasionalmente utilizado para dar respuesta a interrogantes planteados en epidemiología local o a corto plazo (caracterización de brotes, diferenciación de recidivas, reinfecciones y/o fallos terapéuticos, etc).

El método está basado en el principio desarrollado en el análisis de isoenzimas (*multilocus enzyme electrophoresis* -MLEE-), en el que se estudia la movilidad electroforética de un número concreto (generalmente entre 15 y 20) de enzimas metabólicas en geles de almidón o poliacrilamida. Las variaciones observadas en dichas movilidades se corresponden con variaciones en el *locus* o gen codificante de cada enzima. Cada variante es definida como “variante alélica” y los diferentes alelos de cada uno de los genes conforman el perfil alélico que a su vez define el tipo electroforético. Esta medición “indirecta” del polimorfismo genético se convierte en una medición directa en MLST, donde el análisis se basa en la secuencia del ADN de fragmentos internos de genes “*housekeeping*” que codifican enzimas metabólicas. El hecho de utilizar enzimas metabólicas, no sometidos a presión selectiva, permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables (Coll, 2006; Domínguez, 2005).

El proceso de selección de los genes, así como de los fragmentos internos de estos no es universal, es decir, este proceso debe ser realizado para cada especie bacteriana de forma individual. En general, existen regiones específicas de los genes que son las responsables de la mayor parte de la variabilidad observada, mientras que el resto del *locus* presenta un alto grado de conservación. Este hecho ha permitido definir en el desarrollo del MLST que

sería suficiente analizar, de cada gen, solo un fragmento interno de entre 450-500 pb. Así, el nivel de variabilidad combinado entre los genes analizados proporciona un alto grado de discriminación y permite reducir el número de *loci* o genes analizados (Enright, 1999).

Desde que éste sistema se describió en 1998 hasta nuestros días (Maiden, 1998), el método se ha desarrollado para 11 especies diferentes de bacterias. En el caso de *S. aureus*, MLST se aplicó por primera vez en el año 2000 en un estudio de tipaje y caracterización de 155 aislamientos invasivos de *S. aureus* (Enright, 2000). Posteriormente, esta técnica se ha aplicado a numerosos estudios, llegando a la conclusión de que las cepas de SARM tienen una estructura clonal conservada en comparación con los *S. aureus* sensibles a meticilina, y que un número pequeño de clones son las que tienen la capacidad de diseminarse (Oliveira, 2001; Jonhson, 2001). También se han obtenido datos por MLST que indican que *S. aureus* tiene un bajo nivel de recombinación genética y que la diversificación clonal se produce más frecuentemente por mutaciones puntuales que por procesos de intercambio de material genético (Fiel, 2003).

MLST ha sido ocasionalmente utilizado para dar respuesta a los interrogantes planteados en epidemiología local o a corto plazo (caracterización de brotes, diferenciación de recidivas, reinfecciones y/o fallos terapéuticos, etc). Sin embargo, su poder de discriminación es muy inferior al que se obtiene con la aplicación de otros marcadores como el análisis del ADN mediante electroforesis en campo pulsante, técnicas de tipificación por PCR, AFLP, etc.

Es una técnica diseñada para el seguimiento de clones y/o líneas clonales y es un buen marcador molecular de la epidemiología a largo plazo. Por el contrario, es una técnica exigente en cuanto a metodología y muy cara, por lo que su uso suele estar restringido a laboratorios de Referencia.

Las cepas de *S. aureus* resistente a meticilina comenzaron a diseminarse por todo el mundo a partir de la década de 1980, constituyendo un problema de primera magnitud en muchos hospitales, sobre todo en las unidades de cuidados intensivos. La prevalencia de SARM en España ha aumentado de forma progresiva en las dos últimas décadas. Dada la importancia que presenta este patógeno para la salud pública y debido a los cambios epidemiológicos y moleculares que se vienen produciendo, se ha planteado realizar en España un estudio multicéntrico con los siguientes objetivos:

1.- *Determinación del porcentaje de resistencia a meticilina en cepas de Staphylococcus aureus aisladas en diferentes hospitales españoles durante el mes de Junio de 2003.*

2.- *Estudio de la sensibilidad a los antibióticos de las cepas de Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM) obtenidas en dicho estudio. Análisis de los patrones de resistencia antibiótica.*

3.- *Caracterización genotípica de las cepas de SARM. Identificación de los clones epidémicos en las distintas Comunidades Autónomas de España.*

4.- *Detección de los genes de resistencia a macrólidos, lincosaminas y estreptogramina-B. Estudio de la distribución de estos genes en los distintos clones de SARM.*

5.- *Estudio de la producción de Leucocidina de Panton-Valentine en todas las cepas de SARM de adquisición extrahospitalaria y en una selección de cepas de origen nosocomial.*

***M*ATERIALES Y MÉTODOS**

1. Diseño del estudio

En el marco de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), a través de los Grupos de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH) y de Mecanismos de Acción y Resistencia a los Antimicrobianos (GEMARA), y de la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), se contactó con los hospitales miembros invitándoles a participar en un proyecto cuyos objetivos eran la investigación sobre aspectos microbiológicos, epidemiológicos, clínicos y terapéuticos de las infecciones por SARM en hospitales españoles. Se requirió la formación en cada centro de un equipo investigador integrado, como mínimo, por un microbiólogo y un infectólogo o clínico con dedicación a las enfermedades infecciosas; además era preferible que otros profesionales como un preventivista o epidemiólogo y personal de enfermería encargado del control de infecciones pudieran participar en el proyecto.

Se diseñó un estudio prospectivo de cohortes, que consistía en recoger todos los casos nuevos de infección o colonización por SARM detectados en los hospitales participantes durante el mes de Junio de 2003. En el proyecto debían incluirse todos los pacientes nuevos en los que se aislase SARM en una muestra clínica (una muestra solicitada con la intención de hacer un diagnóstico etiológico de un supuesto cuadro infeccioso); no se incluyeron aquellos pacientes detectados solo a partir de cultivos de vigilancia (ejemplo, frotis nasales o de piel realizados con la intención exclusiva de detección de portadores). Tampoco se incluyeron los pacientes que al inicio del mes ya habían sido detectados como infectados o colonizados por SARM, salvo que la detección previa del paciente hubiera sido solo debida a la realización de un cultivo de vigilancia.

Se recogieron además, aspectos relacionados con las características del centro (anexo 1), métodos microbiológicos y, de cada uno de los casos, información referente al paciente y su infección (en su caso) y los datos correspondientes a la sensibilidad antibiótica del microorganismo aislado (anexo 3). En un cuestionario independiente (anexo 2) se recogió la información referente a las medidas de control llevadas a cabo en cada centro. Las cepas de SARM correspondientes aisladas se enviaron al centro de

referencia (Laboratorio de Microbiología, Hospital Universitario de Bellvitge). Solo se envió un aislado por paciente (preferentemente el primero).

Los pacientes fueron seguidos hasta 30 días después del día en que se tomó el cultivo, o, en caso de que ocurrieran antes, hasta el fallecimiento o el alta (si es que estaba ingresado).

Los pacientes no ingresados también fueron incluidos. Los datos se recogieron de la historia clínica (si existe), entrevista con el médico a cargo del paciente y entrevista con el paciente si es necesario.

Dado que la colonización por SARM puede ser persistente, no es posible definir con precisión si la adquisición de SARM fue nosocomial ó comunitaria en pacientes que hayan sido ingresados con anterioridad. Por tanto, se definieron:

- Adquisición comunitaria: cuando SARM se aisló en las primeras 48 horas de ingreso del paciente, o de un paciente no ingresado, siempre que el paciente no hubiese sido ingresado o hubiese tenido contacto con el sistema sanitario durante el año previo.

- Adquisición incierta: cuando SARM fue aislado en las primeras 48 horas de ingreso del paciente, o de un paciente no ingresado, que haya estado ingresado durante el año previo o haya tenido contacto con el sistema sanitario, en al menos una ocasión.

- Adquisición nosocomial: SARM se aísla de un paciente que lleva más de 48 horas ingresado.

- Adquisición nosocomial importada: cuando el paciente haya sido ingresado directamente desde otro hospital, y SARM se aísla en las primeras 48 horas de ingreso en el nuevo hospital.

Los cuestionarios referentes a los datos generales del hospital (anexo 1) y particulares en cada caso de infección o colonización por SARM (anexo 3) se incluyen a continuación. No se incluye el anexo 2, puesto que los aspectos que analiza quedan fuera del alcance de esta tesis.

(Anexo 1)

ESTUDIO GEIH-GEMARA-REIPI-SARM 2003. PROTOCOLO DE DATOS DEL HOSPITAL

Nombre del Hospital: Código (no rellenar):
Ciudad:

Investigadores del centro	Servicio	e-mail
.....
.....
.....

Tipo de Hospital: Comarcal General Regional Otros
Población atendida:

Se realizan transplantes: Órganos sólidos Órganos
 Médula ósea
 Ninguno

Dispone de: Unidad de quemados

	Camas	Ingresos en el mes de estudio	Estancias en el mes de estudio
Hospital			
UCI adultos*			
UCI neonatal			
UCI pediátrica			
Servicios médicos			
Servicios quirúrgicos y M-Q			
Pediatría (excepto UCI neonatal)			

*Si el hospital tiene más de un tipo de UCI especificarlas en las filas en blanco

En el mes de estudio:

- Señale el N° total de pacientes nuevos en los que se ha aislado *S. aureus* sensible a meticilina, excluyendo las procedentes de estudios de colonización o vigilancia:
- De estos, se consideran de adquisición comunitaria y nosocomial

Si no puede dar este dato por pacientes, entonces indique:

- N° total de aislamientos de *S. aureus* sensible a meticilina en el mes de estudio
- N° total de aislamientos de *S. aureus* resistente a meticilina en el mes de estudio

Especifique, marcando con una X, el sistema utilizado en su laboratorio para el estudio de la sensibilidad en *S. aureus* y la frecuencia:

	Rutina	Ocasional
Disco-difusión		
E-Test		
Microdilución		
Sistemas automatizados (Cual?:)		

¿Utiliza algún método, fenotípico ó genotípico (E-Test, Látex para detectar PBP2a, PCR)
para confirmar la resistencia a meticilina en las cepas de *S. aureus*?

- Nunca
- Siempre (Especifique cual)
- Ocasionalmente (Especifique cual)

(Anexo 3)

ESTUDIO GEIH-GEMARA-REIPI SARM 2003. PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS DE LOS CASOS Y DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE LAS CEPAS DE *S.aureus* RESISTENTES A METICILINA (debe rellenarse un protocolo por caso)

Hospital: **Código:**

1. Identificación paciente (dos primeras letras de primer apellido, dos primeras letras de segundo apellido y dos primeras letras del nombre:Código (no rellenar):

2. Edad: años meses días **Sexo:** H M

3. Enfermedad crónica de base: SI NO.

- Diabetes Enf. pulmonar crónica Insuf. cardiaca
- Enf. vascular periférica Enf. tejido conectivo
- Enfermedad hepática sin complicaciones con complicaciones
- Accidente vascular cerebral Leucemia Linfoma
- Neoplasia sólida sin metástasis Neoplasia sólida con metástasis
- Enfermedad renal moderada o severa SIDA
- Otras

Pié diabético Úlcera por presión Obesidad mórbida

Índice Chalsón (no rellenar):

Gravedad de la enfermedad crónica (McCabe): No fatal Últimamente fatal

Rápidamente fatal

Motivo de ingreso:

Índice APACHE II (solo casos de infección):

4. Área de hospitalización: Unidad ó servicio:

Adultos: Urgencias Médico Quirúrgico UCI

Pediatría: Urgencias Médico Quirúrgico UCI

No ingresado

5. Fecha de cultivo:/...../..... **Estancia previa al cultivo:** días

6. Tipo de muestra: Hemocultivo Esputo ó aspirado bronquial Lavado bronquioalveolar ó cepillo bronquial telescópico Otra respiratoria Herida/absceso (Localización.....)

Orina Catéter LCR Articular Osea Otros

7. Adquisición de SARM:

Comunitaria

Procede de centro socio-sanitario (residencia, asilo, otras).

Nosocomial

Nosocomial importada. Hospital de procedencia

Incierta

Ingreso en año previo Hemodiálisis u otro tipo de diálisis

Visitado en las consultas externas del hospital

8. Factores extrínsecos (presentes el día de la toma de la muestra):

Catéter venoso: central periférico Catéter arterial Sonda urinaria

Sonda nasogástrica (aspiración) Sonda nasogástrica (alimentación)

Ventilación mecánica invasiva Alimentación parenteral

Cirugía Localización: Craneal Cabeza-Cuello-ORL Tórax Abdominal

Miembros Otras

Hemodiálisis Diálisis peritoneal

Otros

9. ¿Había tenido aislamiento de SARM este paciente con anterioridad?

SI (ingreso actual Ingreso previo en nuestro centro En otro centro) No

10. Antibioterapia previa a la toma del cultivo: SI NO

- Ingresados (recoger todos los que haya recibido durante >24 horas durante el ingreso hasta la fecha del cultivo):

.....

- No ingresados (recoger todos los que haya recibido en los últimos dos meses): Si este dato es imposible, anotar al menos si ha tomado algún antibiótico en ese periodo.

.....

11. Aspectos clínicos:

Colonización Infección. Tipo de infección: Especificar

Según criterios de los CDC: (señalar uno, aunque esté relacionado con la cirugía)

Neumonía Otras infecciones respiratorias (especificar).....

Meningitis Infección del tracto urinario

Bacteriemia primaria por catéter (segura ó probable)

Endocarditis Artritis Osteomielitis Piel y tejidos blandos

Otra

Si además la infección está en relación con cirugía: Inf. de localización quirúrgica:

incisión–superficial incisión-profunda órgano/espacio (especificar)

Clínica:

Tª máxima el día de la toma de la muestra: °C

Sepsis Sepsis grave Shock séptico

Bacteriemia secundaria Foco secundario Endocarditis

Otras complicaciones:

En caso de bacteriemia: se realizó ecocardiograma SI (TT TE) NO

En caso de infección de catéter vascular: se retiró el catéter: Sí No

12. Tratamiento antimicrobiano sistémico:

- Empírico (antes de conocer etiología y sensibilidad):

Apropiado No apropiado

Antimicrobiano	Vía (IV, IM, oral)	Dosis	Día inicio	Día final

- Dirigido (tras conocer sensibilidad):

Apropiado No apropiado

Antimicrobiano	Vía (IV, IM, oral)	Dosis	Día inicio	Día final

13. Tratamiento de descolonización: SI (especificar antimicrobiano:) NO

14. Pronóstico (al alta ó a los 30 días de hospitalización si sigue ingresado)

Recidiva: SI NO

Muerte: SI (relacionada con la infección) NO

Estancia posterior a la toma de la muestra: días

15. **Sensibilidad antibiótica del aislamiento** (a los antibióticos estudiados por el centro participante):

Antimicrobiano	mm (disco difusión)	S ó R	mg/L (microdilución, Etest, otros)	S ó R
Penicilina				
Oxacilina				
Eritromicina				
Clindamicina				
Cotrimoxazol				
Cloramfenicol				
Gentamicina				
Tobramicina				
Amikacina				
Tetraciclina				
Rifampicina				
Ciprofloxacina				
Levofloxacina				
Vancomicina				
Teicoplanina				
Mupirocina				
Quinupristina/ Dalfopristina				
Linezolid				

2. Identificación bioquímica de los aislamientos recibidos

Todas las cepas SARM recibidas fueron identificadas con un número e introducidas en una base de datos. Se pasaron a placas de agar sangre y agar manitol para confirmar la pureza de los cultivos.

En todas las cepas recibidas se confirmó la identificación mediante:

- **Prueba de la Catalasa.**

- **Aglutinación:** el reactivo de aglutinación (Pasteurex®Staph-plus, BioRad) utiliza partículas de látex rojas sensibilizadas con fibrinógeno para la detección de la coagulasa fija ó *clumping factor*, característica de *S. aureus*. También está compuesto de inmunoglobulinas IgG que detectan la proteína A y de anticuerpos monoclonales anticapsulares que detectan los polisacáridos capsulares de *S. aureus*.

- **DNAsa:** permite conocer si los microorganismos tienen el enzima desoxirribonucleasa capaz de degradar las moléculas de DNA existentes en el medio de cultivo con agar. Esto se pone de manifiesto al añadir ácido clorhídrico (ClH) a la superficie del medio, en el que se observa un halo transparente alrededor del crecimiento del microorganismo con actividad DNAsa, quedando opaco el resto de la placa. Esta prueba se utiliza para diferenciar las especies de *S. aureus*, productoras del enzima desoxirribonucleasa, de otras especies de este género que no la producen.

- **Coagulasa:** enzima extracelular libre producido por algunos microorganismos capaz de coagular el plasma. Es una de las pruebas definitivas para la identificación de *S. aureus*, el cual posee actividad coagulasa, a diferencia de otras especies estafilocócicas. Para realizar esta técnica se utilizó un reactivo constituido por plasma de conejo citratado (BioMérieux). Se mezclan 0,5ml del plasma con 0,5ml del caldo de un cultivo de estafilococo, se incuba a 37°C durante 4h y se lee el resultado visualmente. Si el resultado es negativo, se deja en la estufa hasta las 24h. La prueba es positiva si se observa formación de coágulo.

Una vez que estuvo completa la identificación bioquímica de las cepas, éstas se congelaron en un medio de glicerol a - 20° C para evitar posibles contaminaciones y permitir continuar su caracterización fenotípica y genotípica.

3. Estudio de la sensibilidad antibiótica

El estudio de la sensibilidad de las cepas recibidas se realizó mediante el método de disco difusión en agar basado en la técnica de Kirby-Bauer siguiendo las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, anteriormente *National Committee for Clinical Laboratory Standards* o NCCLS) (NCCLS, 2000). Se preparó un inóculo con una turbidez 0,5 de la escala McFarland a partir de un cultivo joven y se sembró en placas agar de Mueller-Hinton de forma homogénea por toda la superficie. Se dejaron secar durante 10-15 minutos y posteriormente se colocaron los discos (Becton Dickinson) impregnados de antibiótico a concentraciones ya estandarizadas. Después de 24h de incubación a 35°C, se realizó la lectura de los halos de inhibición que aparecían alrededor de los discos, interpretándolos según los criterios establecidos por el CLSI (NCCLS, 2004) (Figura 3.1).

Los antibióticos utilizados fueron: Penicilina (10 UI), Oxacilina (1µg), Eritromicina (15 µg), Clindamicina (2 µg), Cotrimoxazol (trimetoprim 1,25 µg /sulfametoxazol 23,75µg), Cloranfenicol (30 µg), Gentamicina (10 µg), Tobramicina (10 µg), Tetraciclina (30 µg), Rifampicina (5 µg), Ciprofloxacino (5 µg), Vancomicina (30 µg), Teicoplanina (30 µg), Mupirocina (5 µg), Ác. Fusídico (10 µg), Sinercid (15 µg) y Linezolid (30 µg).

A cada una de las cepas SARM se le asignó un patrón de resistencia antibiótica (PR) codificado por un número, en función de los antibióticos no beta-lactámicos a los que la cepa fuera resistente, así por ejemplo, las cepas con PR1 fueron aquellas que presentaban resistencia a oxacilina, eritromicina, clindamicina, tetramicina, gentamicina, tobramicina, rifampicina y ciprofloxacino, las cepas con PR2 fueron resistentes a oxacilina, eritromicina, clindamicina, tobramicina y ciprofloxacino. Estos perfiles de resistencia nos permiten obtener una relación de los diferentes fenotipos que comprenden las cepas SARM recibidas.

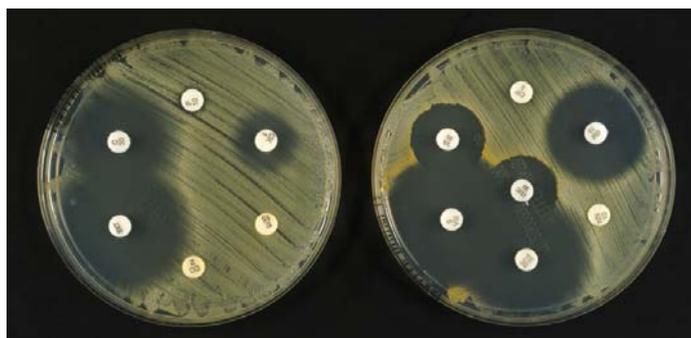


Figura 3.1- Antibiograma de *S.aureus* realizado mediante disco-difusión para los siguientes antibióticos: penicilina, oxacilina, eritromicina, cotrimoxazol, cloranfenicol, gentamicina, tobramicina, tetraciclina, rifampicina, vancomicina, ciprofloxacino y mupirocina.

La resistencia a macrólidos y lincosamidas se detectó utilizando discos de eritromicina (15µg) y de clindamicina (2µg) colocados, en una placa de Mueller-Hinton previamente inoculada, con una distancia de 15-25 mm entre los bordes de ambos discos (CLSI, 2004). Después de 24h de incubación a 35°C las zonas de inhibición fueron interpretadas según su tamaño y forma, con el fin de detectar cualquier aplanamiento de la forma en la zona de la clindamicina (D-Zona), indicando resistencia inducible. Hecho que nosotros interpretamos como clindamicina resistente. Si por el contrario, no se producía un efecto D-zona, consideramos que la cepa era sensible o resistente a clindamicina en función del tamaño de los halos de inhibición (figura 3.2).

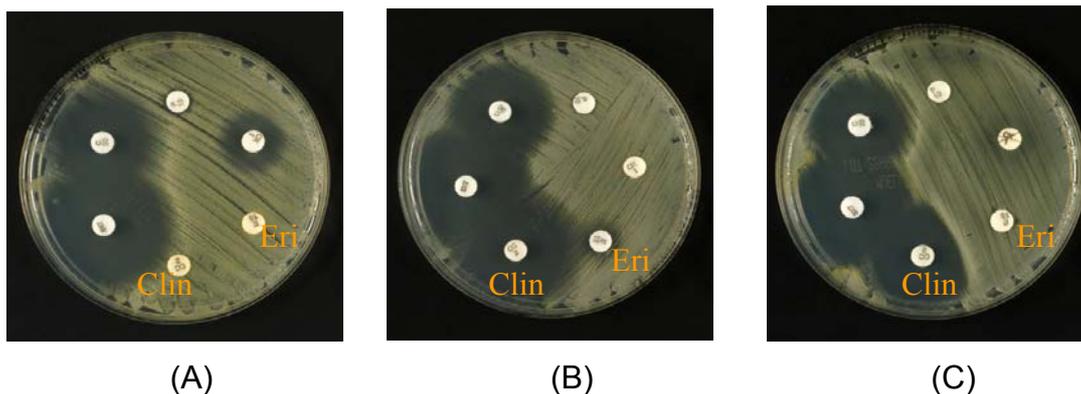


Figura 3.2- Test de inducción del disco de clindamicina (Clin) al ponerlo próximo al disco de eritromicina (Eri). (A) Resistencia constitutiva a clindamicina. No se observa zona de inhibición alrededor de ninguno de los dos discos. (B) Ausencia de resistencia inducible a clindamicina. El disco de clindamicina es sensible y no está inducido por la eritromicina. (C) Presencia de resistencia inducible a clindamicina. La zona de clindamicina adyacente al disco de eritromicina presenta una zona de inhibición (efecto D-zona).

El estudio de sensibilidad para la estreptogramina B se realizó utilizando discos de estreptogramina B (25 µg) para los que se utilizó sustancia valorada. Consideramos como resistentes aquellas cepas que presentaban un halo de inhibición ≤ 19 mm, según estudios de Andrews, *et al* (Andrews, 1999)

Las cepas de SARM que presentaron resistencia a mupirocina por el método de disco-difusión se les determinó la CMI mediante el método de la tira de E-test (AB BIODISK). En función de la CMI obtenida fueron consideradas como aislamientos con bajo nivel de resistencia a mupirocina aquellos que presentaron una CMI en el rango de 8 a 256 µg/mL y aislamientos con alto nivel de resistencia aquellos cuya CMI fue >256 µg/mL (Gilbart, 1993; Finlay, 1997).

La detección de cepas con sensibilidad disminuida a glucopéptidos (GISA) se realizó utilizando placas de agar de Mueller-Hinton con 2µg/mL de vancomicina a las que se inoculó con una suspensión de 0,5 McFarland, realizándose una lectura a las 24 y 48h de incubación a 37°C. A las cepas que crecieron en este primer cribaje se les determinó la CMI a vancomicina y teicoplanina mediante E-test siguiendo las recomendaciones del EARSS (European antimicrobial resistance surveillance system). Así, se inocularon placas de agar de infusión de cerebro-corazón (BHI –*Brain Heart Infusion*-) con una densidad de 2 McFarland donde se aplicaron las tiras de E-test de vancomicina y teicoplanina y se dejaron incubar a 37°C. A las 24h y a las 48h se procedió a su lectura según los criterios de interpretación del EARSS. Las cepas estudiadas se consideraron GISA si la CMI de teicoplanina es ≥ 12 µg/mL ó teicoplanina ≥ 8 µg/mL y vancomicina ≥ 8 µg/mL (EARSS, 2005). Las cepas que crecieron en vancomicina de 2µg/mL también fueron sometidas a un cribaje utilizando placas de agar de BHI conteniendo vancomicina de 6µg/mL, según recomienda el CDC (CDC, 2004). La cepa control utilizada para el cribaje de GISA fue *S.aureus* ATCC 700698 (Mu 3).

4. Confirmación de la resistencia a meticilina

La confirmación de la resistencia a meticilina se realizó en todas las cepas una vez que éstas estuvieron identificadas bioquímicamente y se conocía su sensibilidad antibiótica por disco-difusión. La técnica utilizada para confirmar la presencia del gen *mecA* fue la técnica de PCR.

4.1. Técnica de PCR para detección del gen *mecA*

La síntesis de PBP2a está codificada por el gen *mecA*, que se encuentra en el cromosoma de las cepas estafilocócicas resistentes a meticilina. La técnica de elección para la detección del gen *mecA* es la amplificación mediante una reacción de PCR. Para realizar ésta técnica se utilizaron cuatro iniciadores, dos que son complementarios del gen *mecA* (*mecA*-1 y *mecA*-2) y otros dos que son complementarios de una secuencia universal de DNA ribosomal (Rib-1 y Rib-2) y que actúan como control interno de la reacción de amplificación (Tabla 1.1) (Geha, 1994).

Tabla 1.1. Secuencias de los iniciadores que amplifican el gen *mecA*.

INICIADOR	SECUENCIA	POSICION EN GEN <i>mecA</i>	TAMAÑO AMPLIFICADO
<i>mecA</i> -1	5' GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A 3'	318-342	310 pb
<i>mecA</i> -2	5' CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A 3'	603-627	
INICIADOR	SECUENCIA	POSICION EN 16SrRNA	TAMAÑO AMPLIFICADO
Rib-1	5' GGA ATT CAA A(T/G,1:1)G AAT TGA CGG GGG C 3'	911-930	479 pb
Rib-2	5' CGG GAT CCC AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC 3'	1371-1390	

La técnica consta de tres partes: extracción del DNA, amplificación del DNA e interpretación de los resultados.

Las cepas control utilizadas para la realización de esta técnica fueron:

- Control positivo: *S. aureus* resistente a meticilina ATCC 700698 (Mu 3)
- Control negativo: *S. aureus* sensible a meticilina ATCC 29213.

4.1.1. Extracción del DNA

Para la extracción del DNA cromosómico se partió de cepas de *S. aureus* de cultivo joven. Las colonias se resuspendieron en 100 µl de una solución de lisis formada por: 6 mM Tris-HCl pH8, 1 M NaCl, 0,1 M EDTA pH8, 0,2% desoxicolato sódico y 0,5% sarcosil, junto con los enzimas líticos, lisoestafina y lisozima, a concentraciones de 25 µg/ml y 50 µg/ml respectivamente. Esta suspensión se incubó a 37°C durante 30 minutos y posteriormente 5 minutos a 95°C. La solución de lisado se diluyó 1/100 en TE (10 mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA pH8), y de ésta, se tomaron 5 µl como DNA molde para la reacción de amplificación.

4.1.2. Amplificación del DNA

La reacción de amplificación del DNA se llevó a cabo con un equipo termociclador Perkin Elmer modelo 9600 y con el enzima Ampli Taq Gold (Applied Biosystems). En cada reacción se utilizaron los siguientes componentes: tampón de PCR a una concentración de x1, MgCl₂ a 1,5 mM, dNTPs a 250 µM, los iniciadores del gen *mecA* (*mecA*-1 y *mecA*-2) se utilizaron a una concentración de 50 pm y los iniciadores del control interno de amplificación (*rib1* y *rib2*) a una concentración de 5 pm . A la mezcla se le añadieron 2 unidades de TaqDNA polimerasa y 5 µl del DNA molde y finalmente se le añadió agua hasta completar un volumen final de 50 µl.

Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 12 minutos para la desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos de amplificación (45 segundos para desnaturalizar a 94°C, 45 segundos para la hibridación a 55°C y 1 minuto a 72°C para el proceso de extensión), y una última fase de extensión de 2 minutos a 72°C y posterior enfriamiento hasta 4°C.

4.1.3. Detección e Interpretación de los resultados

Los fragmentos de DNA amplificados fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en 0,5xTBE (50 mM Tris, 50 mM ácido bórico y 0,2 mM EDTA pH8) a 120 voltios durante 60 minutos. El gel fue cargado con 10-20 µl de producto amplificado y un control de peso molecular de 1 kb. Se tiñó con bromuro de etidio durante 30 minutos. La visualización de los amplificados se realizó sobre un transiluminador de luz ultravioleta.

Las cepas que tienen el gen *mecA*, en el producto de PCR se observa una banda de 310 pb (Figura 4.1). El control interno de amplificación se visualiza como una banda de 479 pb, ésta banda debe estar presente en todas las reacciones para que la técnica se pueda validar.

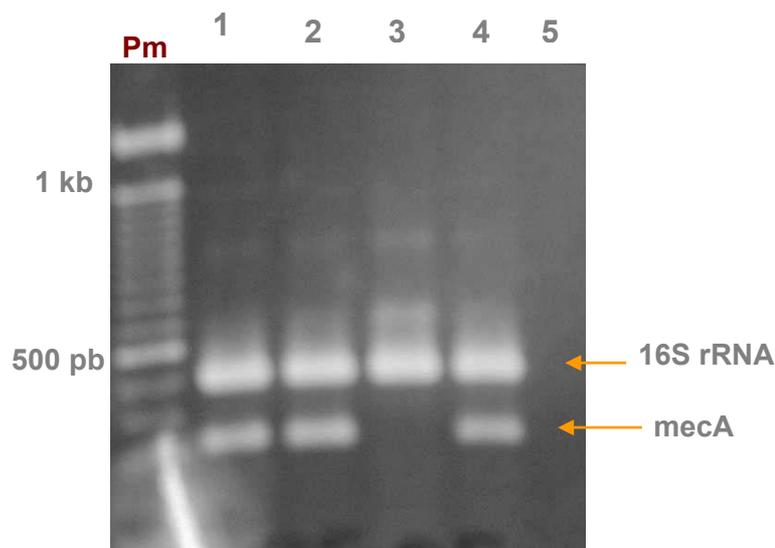


Figura 4.1- Resultado de PCR del gen *mecA*. Los carriles 1, 2 y 4 muestran dos bandas, la superior se refiere al control interno (479 pb) y la inferior a la amplificación del gen *mecA* (310 pb). El carril 3 sólo muestra amplificación del control interno y el carril 5 no muestra ninguna amplificación.

5. Caracterización genotípica

La caracterización genotípica de las cepas SARM se realizó mediante las técnicas de: electroforesis en campo pulsátil (ECP), *Multilocus Sequence Typing* (MLST) y análisis del polimorfismo asociado al *cassette* cromosómico estafilocócico que contiene al gen *mecA* (*Staphylococcal cassette chromosome mec*, SCCmec).

5.1. Electroforesis en campo pulsátil

El análisis del genotipo de las cepas SARM mediante electroforesis en campo pulsátil (ECP) se llevó a cabo en todas las cepas recibidas en el centro de referencia. Para la realización de esta técnica son necesarias tres fases: 1) Extracción del DNA cromosómico bacteriano, 2) Restricción del DNA utilizando enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, y 3) Separación de los fragmentos obtenidos mediante un sistema especial de ECP.

5.1.1. Extracción de DNA

Para la obtención del DNA cromosómico se partió de cultivos de *S. aureus* de crecimiento reciente en un medio de agar sangre. Las colonias contenidas en un asa de cultivo se resuspendieron en 200µl de tampón PIV (0,01mM Tris-HCl pH8, 1 M NaCl). De esta suspensión se añadieron 5 µl en 1ml de PIV y se midió, en un espectrofotómetro, la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 620 nm, obteniendo así el volumen de PIV necesario (*) en el que se tiene que diluir cada muestra para que todas tengan la misma concentración ($DO_{620}=5$).

$$(*) \quad Vol_{dil} = (OD_{620} \times 40 \times 210) - 210$$

A continuación se mezclaron, a partes iguales, el inóculo y una solución de agarosa de bajo punto de fusión (Megabase Agarose, BioRad) al 1,5% y se dispensaron gotas de 20 µl. Se dejaron solidificar durante 5 minutos a -20°C y 10 minutos a temperatura ambiente, obteniendo así un inóculo bacteriano estándar incluido en los moldes de agarosa correspondientes.

Una vez que los moldes de agarosa estuvieron solidificados se pasaron a unos tubos con tampón de lisis (6 mM Tris-HCl pH8, 1 M NaCl, 0,1 M EDTA pH8, 0,2% desoxicolato sódico y 0,5% sarcosil, 50 µg/ml lisoestafina, 100 µg/ml lisozima y 50 µg/ml RNAsa). Se incubaron a 37°C durante 5h, pasadas las cuales la solución de lisis fue sustituida por una solución de proteinasa-K, compuesta de ES (0,5 M EDTA pH9, 1% sarcosil) y 1mg/mL de proteinasa-K. En esta solución los discos de agarosa se incubaron 18h a 50°C.

Posteriormente los discos se lavaron con TE (10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA pH8) en agitación (4 lavados de 30 minutos) para eliminar las impurezas, y se conservaron a 4°C para su posterior uso.

5.1.2. Restricción del DNA

La digestión enzimática del DNA se produce en el mismo disco de agarosa ya que el enzima de restricción difunde a través de él. Se utilizan endonucleasas de baja frecuencia de corte, lo que permite digerir el DNA cromosómico en fragmentos grandes. La digestión se llevó a cabo en un volumen de 40 µl de una solución de restricción compuesta por: el tampón de restricción pre*Sma* (6 mM Tris pH8, 20 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 3,15 µl de 2-mercaptoetanol), el enzima *Sma*I (New England Biolabs, Izasa) a 10 unidades por reacción y la albúmina bovina sérica (BSA) a 016 µg por reacción. Los discos de cada una de las cepas de SARM se mantuvieron en restricción a 25°C durante 18h.

5.1.3. Electroforesis de los fragmentos de restricción e interpretación de resultados

Para la electroforesis se utilizaron geles de agarosa al 1% en un buffer TBE al 0,5x (890 mM Tris, 890 mM Acido bórico, 20 mM EDTA pH 8). En los carriles de los extremos del gel se depositaron marcadores de peso molecular (*Lambda Ladder PFGE Marker*, New England Biolabs, Izasa). La electroforesis se llevó a cabo en el sistema CHEF-DRIII (BioRad), utilizando como tampón TBE al 0,5x. Las condiciones de electroforesis fueron: Para su puesta en marcha se programó con las siguientes condiciones: distribución lineal de pulsos entre 1 y 30 segundos durante 23h, con un voltaje de 6V/cm y una

temperatura de 14°C. Una vez que los ciclos habían finalizado, los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 30m y se observaron bajo luz ultravioleta, captando la imagen mediante foto o cámara digital.

Cada cepa está definida por un patrón de bandas de restricción. La interpretación de los diferentes patrones de banda obtenidos, se realizó siguiendo los criterios de Tenover, con objeto de conocer la relación existente entre las cepas analizadas y poder discernir entre tipos y subtipos (Tenover, 1995). Así, cuando una cepa de SARM difería del resto en más de tres bandas se le asignó un genotipo propio expresado mediante letras; si el número de bandas era de tres o menor se le consideró un subtipo y se expresó con un subíndice numérico (ej. genotipo P₂, significa genotipo P subtipo 2).

5.2. Multilocus Sequence Typing -MLST-

MLST es una técnica desarrollada por Enright y Spratt, en 1998 (Enright, 1999). Consiste en el análisis mediante secuenciación del ADN de fragmentos internos de ~450-500 pb de 7 genes codificantes de distintas enzimas metabólicas bacterianas (“housekeeping genes”). En el caso de estafilococos, se utilizan los fragmentos internos de los siguientes genes: *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmK*, *pta*, *tpi*, *yqiL* (carbamato kinasa, shikimato deshidrogenasa, glicerol kinasa, guanilato kinasa, fosfato acetiltransferasa, triosefosfato isomerasa y acetil coenzima A acetiltransferasa, respectivamente). Para su realización son necesarias tres fases: 1) Extracción del DNA cromosómico bacteriano, 2) Amplificación de los genes metabólicos, y 3) Reacción de secuenciación.

Las cepas control utilizadas en la técnica del MLST fueron las siguientes (Cedidas por H. De Lencastre. The Rockefeller University, New York, USA):

- ATCC BAA-44 (clon ibérico; SCCmec tipo I A; ST247)
- ATCC BAA-41 (clon Nueva York /Japon; SCCmec tipo II; ST5)
- ATCC BAA-39 (clon húngaro; SCCmec tipo III; ST239)
- ATCC BAA-43 (clon brasileño; SCCmec tipo III A; ST239)
- ATCC BAA-42 (clon pediátrico; SCCmec tipo IV; ST5)

5.2.1. Extracción de DNA

Para la extracción del DNA cromosómico se partió de cepas de *S. aureus* de un cultivo joven en agar sangre. Las colonias se resuspendieron en 100 μ l de una solución de lisis formada por: 6 mM Tris-HCl pH8, 1 M NaCl, 0,1 M EDTA pH8, 0,2% desoxicolato sódico y 0,5% sarcosil, junto con los enzimas líticos, lisoestafina y lisozima, a concentraciones de 25 μ g/ml y 50 μ g/ml respectivamente. Esta suspensión se incubó a 37°C durante 30 minutos y posteriormente 5 minutos a 95°C. La solución de lisado se diluyó 1/100 en TE (10 mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA pH8), y de ésta, se tomaron 5 μ l como DNA molde para la reacción de amplificación.

5.2.2. Amplificación de los genes metabólicos

La reacción de amplificación de los fragmentos internos de los 7 genes se llevó a cabo con un equipo termociclador Perkin Elmer modelo 9600 y con el enzima Ampli Taq Gold (Applied Biosystems). En cada reacción se utilizaron los siguientes componentes: tampón de PCR a una concentración de $\times 1$, $MgCl_2$ a 1,5 mM, dNTPs a 250 μ M, los iniciadores de cada uno de los genes, descritos en la tabla 5.1 (Enright, 2000), se utilizaron a una concentración de 85 pmol, en reacciones de amplificación separadas. A la mezcla se le añadió 1 unidad de TaqDNA polimerasa y 5 μ l del DNA molde y finalmente se le añadió agua hasta completar un volumen final de 50 μ l. Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 12 minutos para la desnaturalización a 94°C, 30 ciclos de amplificación (1 minuto para desnaturalización a 94°C, 1 minuto para hibridación a 55°C y 1 minuto a 72°C para el proceso de extensión), y se terminó con una última fase de extensión de 2 minutos a 72°C y posterior enfriamiento hasta 4°C.

Tabla 5.1- Secuencias de los iniciadores que amplifican cada uno de los 7 genes metabólicos que permiten secuenciar el ADN del *S. aureus*.

GEN	INICIADOR	SECUENCIA	TAMAÑO AMPLIFICADO
<i>arcC</i>	arcC-Up	5' TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC 3'	456 pb
	arcC-Dn	5' AGGTATCTGCTTCAATCAGCG 3'	
<i>aroE</i>	aroE-Up	5' ATCGGAAATCCTATTTACATTC 3'	456 pb
	aroE-Dn	5' GGTGTTGTATTAATAACGATATC 3'	
<i>glpF</i>	glpF-Up	5' CTAGGAACTGCAATCTTAATCC 3'	465 pb
	glpF-Dn	5' TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC 3'	
<i>gmk</i>	gmk-Up	5' ATCGTTTTATCGGGACCATC 3'	429 pb
	gmk-Dn	5' TCATTAACACTACAACGTAATCGTA 3'	
<i>pta</i>	pta-Up	5' GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG 3'	474 pb
	pta-Dn	5' GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA 3'	
<i>tpi</i>	tpi-Up	5' TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA 3'	402 pb
	tpi-Dn	5' TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC 3'	
<i>yqiL</i>	yqiL-Up	5' CAGCATACAGGACACCTATTGGC 3'	516 pb
	yqiL-Dn	5' CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC 3'	

acC: carbamato kinasa; **aroE:** shikimato deshidrogenasa; **glpF:** glicerol kinasa; **gmk:** guanilato kinasa; **pta:** fosfato acetiltransferasa; **tpi:** triosefosfato isomerasa; **yqiL:** acetil coenzima A acetiltransferasa.

Purificación de los fragmentos de DNA: Los productos de PCR fueron purificados mediante el sistema de QIAquick (Qiagen, Izasa), según instrucciones del fabricante.

Tras la amplificación y purificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa con 5µl de cada muestra para comprobar la intensidad de las bandas.

5.2.3. Secuenciación de los genes metabólicos

La reacción de secuenciación de los productos de PCR purificados se realizó en placas de microtitulación, en un volumen de 20 µl . Para cada gen a estudiar se desarrollaron dos reacciones de secuenciación, una para cada hebra de ADN, en una de estas reacciones se utilizo el iniciador 3'-5' y en la otra el complementario 5'-3'. Se utilizaron los mismos iniciadores que para la amplificación pero diluidos, alcanzando una concentración final en la reacción

de 4 pm. Se añadieron 3 µl de la mezcla BigDye v3.1 “Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Applied Biosystems) y entre 5 y 7 µl del producto de PCR en función de la intensidad de la banda obtenida. Se completó la reacción con agua hasta alcanzar un volumen final de 20 µl. La reacción se llevó a cabo con un equipo termociclador Perkin Elmer modelo 9600 con las siguientes condiciones: 24 ciclos de amplificación (96°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos y 60°C durante 2 minutos) y una fase de enfriamiento a 4°C.

Purificación de la reacción de secuenciación: Para ello se preparó una solución con 2 µl de 3M de NaOAc, pH^H4.6 y con 50 µl de etanol 100% para cada uno de los pocillos de la placa y se centrifugó a 3800 rpm durante 20 minutos, posteriormente se eliminó el sobrenadante de cada pocillo y se volvió a colocar la placa en la centrífuga pero de forma invertida y sobre un papel absorbente o de filtro durante 2 minutos a 1000 rpm, para eliminar los posibles restos de etanol. Seguidamente, se dispensaron 150 µl de etanol al 70% en cada pocillo centrifugándose nuevamente a 3800 rpm durante 5 minutos y se repitió el proceso de eliminación del sobrenadante y residuos de etanol. Finalmente se resuspendió el pellet con 20 µl del disolvente formamida a cada pocillo y se sometió a un proceso de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos. Una vez finalizado este proceso, la placa se secuenció en un secuenciador automático modelo Abi Prism (Applied Biosystems).

5.2.4. Análisis de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias y tras identificar los cambios nucleotídicos, inserciones y deleciones que pudieran haberse producido en las cepas estudiadas, se compararon estas secuencias con las secuencias pertinentes almacenadas en la página web www.mlst.net. Así, para cada gen se obtuvo un alelo, y el perfil alélico de las cepas configuró el tipo secuencial correspondiente (*Sequence Type*, ST).

5.3. Análisis del polimorfismo asociado al cassette cromosómico estafilocócico que contiene al gen *mecA* (*Staphylococcal cassette chromosome mec*, SCCmec)

El gen *mecA* que codifica la resistencia a meticilina forma parte de un elemento genético denominado *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec).

La estructura genética del SCCmec está compuesta por el gen *mec*, genes *ccr* y otros elementos genéticos adicionales como son plásmidos, transposones y secuencias de inserción, que codifican determinadas resistencias antibióticas. En función de la presencia o no de algunos de estos elementos, se caracterizan los diferentes tipos de SCCmec (I-V).

La identificación de los tipos de SCCmec y sus variantes se realizó mediante la amplificación por PCR de algunos de los elementos más característicos de cada uno de los tipos SCCmec, según lo descrito por Oliveira *et al* (Oliveira, 2002).

Se amplificaron, por separado ocho *loci* distintos (A-H). El gen *mecA* se utilizó como control interno de la reacción de amplificación (Tabla 5.2) (Oliveira, 2002).

Tabla 5.2. Secuencias de los iniciadores que amplifican cada uno de los *locus* que integran el SCCmec. Tipo de SCCmec que identifican.

LOCUS	INICIADOR	SECUENCIA	TAMAÑO AMPLIFICADO	TIPO SCCmec
A	CIF2 F2	5' TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG 3'	495 pb	I
	CIF2 R2	5' ATTTACCACAAGGACTACCAGC 3'		
B	KDP F1	5' AATCATCTGCCATTGGTGATGC 3'	284 pb	II
	KDP R1	5' CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG 3'		
C	MECI P2	5' ATCAAGACTTGCATTTCAGGC 3'	209 pb	II, III
	MECI P3	5' GCGGTTTCAATTCACCTTGTC 3'		
D	DCS F2	5' CATCCTATGATAGCTTGGTC 3'	342 pb	I, II, IV
	DCS R1	5' CTAAATCATAGCCATGACCG 3'		
E	RIF4 F3	5' GTGATTGTTTCGAGATATGTGG 3'	243 pb	III
	RIF4 R9	5' CGCTTTATCTGTATCTATCGC 3'		
F	RIF5 F10	5' TTCTTAAGTACACGCTGAATCG 3'	414 pb	III
	RIF5 R13	5' GTCACAGTAATTCCATCAATGC 3'		
G	IS431 P4	5' CAGGTCTCTTCAGATCTACG 3'	381 pb	IA
	pUB110 R1	5' GAGCCATAAACACCAATAGCC 3'		
H	IS431 P4	5' CAGGTCTCTTCAGATCTACG 3'	303 pb	IIIA
	pT181 R1	5' GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC 3'		
<i>mecA</i>	mecA-1	5' GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A 3'	310 pb	Control
	mecA-2	5' CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A 3'		Interno

Locus **A**: corresponde al gen CIF, se encuentra situado por debajo del gen *pIs*. Locus **B**: es interno al operón *kdp*. Locus **C**: es interno al gen *mecI* (secuencia inhibidora del mec). Locus **D**: es interno a la región *dcs*. Locus **E**: corresponde al gen RIF4, se encuentra situado entre la región integrada por el plásmido pI258 y el transposón Tn554. Locus **F**: corresponde al gen RIF5, se encuentra situado entre la región del Tn554 y la unión cromosómica (*orfX*). Locus **G**: situado en la unión izquierda entre IS431 y pUB110. Locus **H**: situado en la unión izquierda entre IS431 y pT181.

La técnica consta de tres partes: extracción del DNA, amplificación del DNA e interpretación de los resultados.

Las cepas control utilizadas en la técnica del MLST fueron las siguientes (Cedidas por H. De Lencastre. The Rockefeller University, New York, USA):

- ATCC BAA-44 (clon ibérico; SCCmec tipo I A; ST247)

- ATCC BAA-41 (clon Nueva York /Japon; SCCmec tipo II; ST5)
- ATCC BAA-39 (clon húngaro; SCCmec tipo III; ST239)
- ATCC BAA-43 (clon brasileño; SCCmec tipo III A; ST239)
- ATCC BAA-42 (clon pediátrico; SCCmec tipo IV; ST5)

5.3.1. Extracción del DNA

Para la extracción del DNA cromosómico se partió de cepas de *S. aureus* de cultivo joven en placas de agar sangre. Las colonias se resuspendieron en 100 µl de una solución de lisis formada por: 6 mM Tris-HCl pH8, 1 M NaCl, 0,1 M EDTA pH8, 0,2% desoxicolato sódico y 0,5% sarcosil, junto con los enzimas líticos, lisoestafina y lisozima, a concentraciones de 25 µg/ml y 50 µg/ml respectivamente. Esta suspensión se incubó a 37°C durante 30 minutos y posteriormente 5 minutos a 95°C. La solución de lisado se diluyó 1/100 en TE (10 mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA pH8), y de ésta, se tomaron 5 µl como DNA molde para la reacción de amplificación.

5.3.2. Amplificación del DNA

La reacción de amplificación del DNA se llevó a cabo con un equipo termociclador Perkin Elmer modelo 9600 y con el enzima Ampli Taq Gold (Applied Biosystems). En cada reacción se utilizaron los siguientes componentes: tampón de PCR a una concentración de x1, MgCl₂ a 2 mM, dNTPs a 25 µM, los iniciadores del locus A se utilizaron a una concentración de 65 pm para el primer CIF2 F2 y de 75 pm para el primer CIF2 R2, en el locus B (KDP F1 y KDP R1) ambos iniciadores se utilizaron a una concentración de 29 pm, en el locus C (MECI P2 y MECI P3) la concentración de ambos iniciadores fue de 81pm, en el locus D la concentración fue de 77 pm para el primer DCS F2 y 63 pm para el primer DCS R1, en el locus E (RIF4 F3 y RIF4 R9) la concentración utilizada de ambos iniciadores fue de 34 pm, en el locus F (RIF5 F10 y RIF5 R13) se utilizó una concentración de 66 pm de ambos iniciadores, en el locus G la concentración fue de 75 para el primer IS431 P4 y de 65 para el primer pUB110 R1, y los iniciadores del locus H se utilizaron a una concentración de 75 para el primer IS431 P4 y de 70 pm para el primer pT181 R1. Para los iniciadores del control interno de amplificación (mecA-1 y mecA-2) se utilizó una concentración de 50 pm. A la mezcla se le añadió 1 unidad de

TaqDNA polimerasa y 5 µl del DNA molde y finalmente se le añadió agua hasta completar un volumen final de 50 µl.

Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 12 minutos para la desnaturalización a 94°C, 30 ciclos de amplificación (45 segundos para desnaturalización a 94°C, 45 segundos para la hibridación a 55°C y 1 minuto a 72°C para el proceso de extensión), y se terminó con una última fase de extensión de 2 minutos a 72°C y posterior enfriamiento hasta 4°C.

5.3.3. Detección e Interpretación de los resultados

Los fragmentos de DNA amplificados fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en 0,5xTBE (50 mM Tris, 50 mM ácido bórico y 0,2 mM EDTA pH8) a 120 voltios durante 60 minutos. El gel fue cargado con 10-20 µl de producto amplificado y un control de peso molecular de 1 kb. Se tiñó con bromuro de etidio durante 30 minutos. La visualización de los amplificados se realizó sobre un transiluminador de luz ultravioleta.

En el siguiente esquema se exponen las diferentes bandas que se observan del producto de PCR, en cada uno de los tipos de SCCmec:

TIPO SCCmec	BANDA (pb)	LOCUS
I	495, 342	A, D
IA	495, 342, 381	A, D, G
II	381, 342, 284, 209	G, D, B, C
III	414, 303, 243, 209	F, H, E, C
IIIA	414, 243, 209	F, E, C
IIIB	209	C
IV	342	D
IVA	342, 381	D, G

El control interno de amplificación se visualiza como una banda de 310 pb. Esta banda debe estar presente en todas las reacciones que contienen DNA molde para que la técnica se pueda interpretar.

Hasta el momento hay descritos un número reducido de tipos de SCCmec lo que hace que se considere un método poco discriminatorio. Por el contrario, es un método rápido de identificación de los diferentes tipos estructurales del elemento mec y contribuye a una mejor caracterización y relación clonal entre los diferentes aislamientos de SARM.

6. Estudio de los genes de resistencia a macrólidos.

La detección de los genes de resistencia a macrólidos se realizó por PCR en todas las cepas SARM recibidas resistentes a eritromicina. Se estudiaron los genes codificantes de metilasas *ermA*, *ermB*, *ermC* y el gen responsable de un sistema de expulsión activa *msrA*.

6.1. Técnica de PCR para detección de los genes *ermA*, *ermB*, *ermC* y *msrA*.

Para realizar ésta técnica se utilizaron cuatro parejas de iniciadores por separado, una para cada gen a amplificar (Tabla 6.1) (Lina, 1999)

Tabla 6.1. Secuencias de los iniciadores que amplifican cada uno de los genes de resistencia a macrólidos.

INICIADOR	SECUENCIA	TAMAÑO AMPLIFICADO
ermA-1	5' -GTTCAAGAAC AATCAATACA GAC- 3'	421 pb
ermA-2	5' -GGATCAGGAA AAGGACATTT TAC- 3'	
INICIADOR	SECUENCIA	TAMAÑO AMPLIFICADO
ermB-1	5' -CCGTTTACGA AATTGGAACA GGTAAAGGGC- 3'	359 pb
ermB-2	5' -GAATCGAGAC TTGAGTGTGC- 3'	
INICIADOR	SECUENCIA	TAMAÑO AMPLIFICADO
ermC-1	5' -GCTAATATTG TTAAATCGT CAATTCC- 3'	572 pb
ermC-2	5' -GGATCAGGAA AAGGACATTT TAC- 3'	
INICIADOR	SECUENCIA	TAMAÑO AMPLIFICADO
msrA-1	5' -GGCACAATAA GAGTGTTTAA AGG- 3'	940 pb
msrA-2	5' -AAGTTATATC ATGAATAGAT TGTCCTGTT- 3'	

La técnica consta de tres partes: extracción del DNA, amplificación del DNA e interpretación de los resultados.

6.1.1. Extracción del DNA

Para la extracción del DNA cromosómico se partió de cepas de *S. aureus* de un cultivo joven en agar sangre. Las colonias se resuspendieron en 100 µl de una solución de lisis formada por: 6 mM Tris-HCl pH8, 1 M NaCl, 0,1 M EDTA pH8, 0,2% desoxicolato sódico y 0,5% sarcosil, junto con los enzimas líticos, lisoestafina y lisozima, a concentraciones de 25 µg/ml y 50 µg/ml respectivamente. Esta suspensión se incubó a 37°C durante 30 minutos y posteriormente 5 minutos a 95°C. La solución de lisado se diluyó 1/100 en TE (10 mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA pH8), y de ésta, se tomaron 5 µl como DNA molde para la reacción de amplificación.

6.1.2. Amplificación del DNA

La reacción de amplificación del DNA se llevó a cabo con un equipo termociclador Perkin Elmer modelo 9600 y con el enzima Ampli Taq Gold (Applied Biosystems). En cada reacción se utilizaron los siguientes componentes: tampón de PCR a una concentración de x1, MgCl₂ a 2 mM, dNTPs a 250 µM, los iniciadores de los genes *ermA* (*ermA*-1 y *ermA*-2), *ermB* (*ermB*-1 y *ermB*-2) y *ermC* (*ermC*-1 y *ermC*-2) se utilizaron a una concentración de 96 pm; para amplificar el gen *msrA* se utilizó *msrA*-1 a una concentración de 100 pm y *msrA*-2 a 84 pm. A la mezcla se le añadieron 2 unidades de TaqDNA polimerasa y 5 µl del DNA molde y finalmente se le añadió agua hasta completar un volumen final de 50 µl.

Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 12 minutos para la desnaturalización a 94°C, 30 ciclos de amplificación (45 segundos para desnaturalización a 94°C, 45 segundos para la hibridación a 50°C y 1 minuto a 72°C para el proceso de extensión), y se terminó con una última fase de extensión de 2 minutos a 72°C y posterior enfriamiento hasta 4°C.

6.1.3. Detección e Interpretación de los resultados

Los fragmentos de DNA amplificados fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en 0,5xTBE (50 mM Tris, 50 mM ácido

bórico y 0,2 mM EDTA pH8) a 120 voltios durante 60 minutos. El gel fue cargado con 10-20 µl de producto amplificado y un control de peso molecular de 1 kb. Se tiñó con bromuro de etidio durante 30 minutos. La visualización de los amplificados se realizó sobre un transiluminador de luz ultravioleta.

Las cepas que tienen el gen *ermA*, en el producto de PCR se observa una banda de 421 pb, las cepas con el gen *ermB* la banda es de 359 pb, las cepas con el gen *ermC* la banda es de 572 pb y las cepas con el gen *msrA* la banda que se observa es de 940 pb (Figura 6.1).

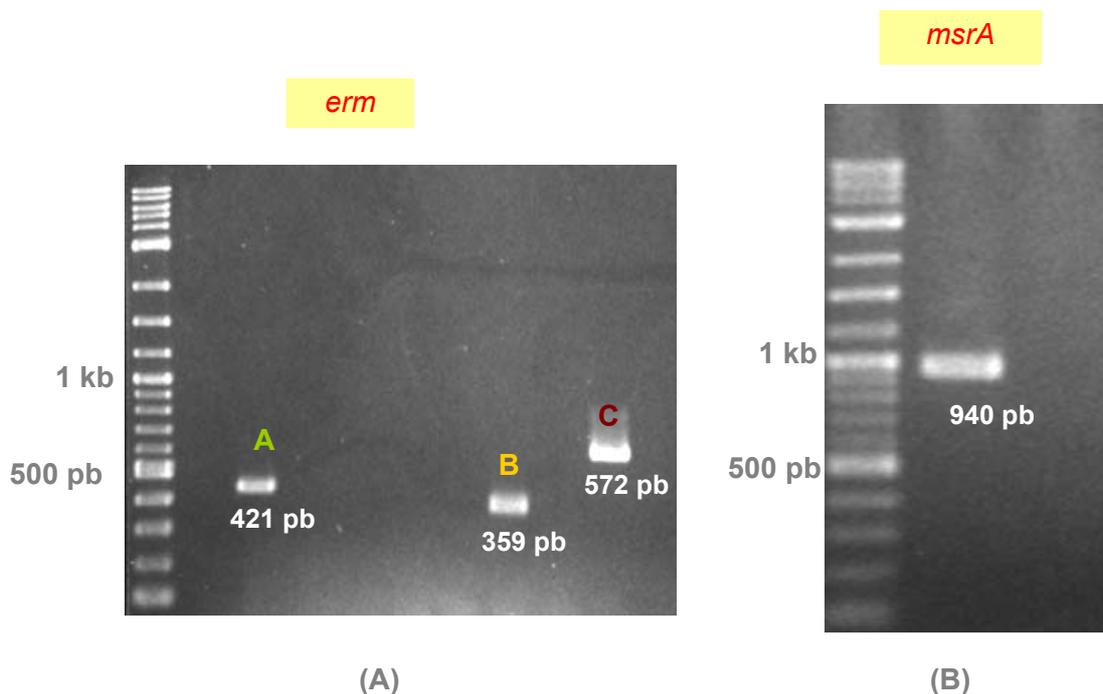


Figura 6.1- Resultado de PCR de los genes de resistencia a macrólidos.

(A): genes *ermA*, *ermB* y *ermC*.

(B): gen *msrA*.

7. Detección de la Leucocidina de Panton-Valentine.

El estudio de la presencia del gen productor de la Leucocidina de Panton-Valentine (LPV) se llevó a cabo en todas las cepas en las que se comunicó, mediante la encuesta epidemiológica, adquisición comunitaria o adquisición incierta.

La LPV es una toxina, cuya acción viene mediada por la acción sinérgica de dos clases de proteínas secretoras, denominadas S y F, que están codificadas por dos genes, *lukS-PV* y *lukF-PV*. La técnica de elección para la detección del gen *luk-PV* es la PCR ó amplificación del DNA. Para realizar ésta técnica se utilizan los iniciadores *Luk-PV-1* y *Luk-PV-2* (Tabla 7.1) (Lina, 1999).

Tabla 7.1. Secuencias de los iniciadores que amplifican los genes de la Leucocidina de Panton-Valentine.

INICIADOR	SECUENCIA	TAMAÑO AMPLIFICADO
Luk-PV-1	5' -ATCATTAGGTAAA ATGTCTGGACATGATCCA- 3'	433 pb
Luk-PV-2	5' -GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAGC-3'	

La técnica consta de tres partes: extracción del DNA, amplificación del DNA e interpretación de los resultados.

La cepa control utilizada para la detección de la LPV fue:

- *S. aureus* resistente a meticilina HT2002 0221 (Cedida por J. Etienne, Hopital Edouard Herriot, Lyon, Francia).

7.1. Extracción del DNA

Para la extracción del DNA cromosómico se partió de cepas de *S. aureus* de un cultivo joven en agar sangre. Las colonias se resuspendieron en 100 µl de una solución de lisis formada por: 6 mM Tris-HCl pH8, 1 M NaCl, 0,1 M EDTA pH8, 0,2% desoxicolato sódico y 0,5% sarcosil, junto con los enzimas líticos, lisoestafina y lisozima, a concentraciones de 25 µg/ml y 50 µg/ml respectivamente. Esta suspensión se incubó a 37°C durante 30 minutos y posteriormente 5 minutos a 95°C. La solución de lisado se diluyó 1/100 en TE

(10 mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA pH8), y de ésta, se tomaron 5 µl como DNA molde para la reacción de amplificación.

7.2. Amplificación del DNA

La reacción de amplificación del DNA se llevó a cabo con un equipo termociclador Perkin Elmer modelo 9600 y con el enzima Ampli Taq Gold (Applied Biosystems). En cada reacción se utilizaron los siguientes componentes: tampón de PCR a una concentración de x1, MgCl₂ a 2 mM, dNTPs a 25 µM, los iniciadores del gen *luk-PV* (*luk-PV-1* y *Luk-PV-2*) se utilizaron a una concentración de 48 pm. A la mezcla se le añadió 1 unidad de TaqDNA polimerasa y 5 µl del DNA molde y finalmente se le añadió agua hasta completar un volumen final de 50 µl.

Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 12 minutos para la desnaturalización a 94°C, 30 ciclos de amplificación (45 segundos para desnaturalización a 94°C, 45 segundos para la hibridación a 55°C y 1 minuto a 72°C para el proceso de extensión), y se terminó con una última fase de extensión de 2 minutos a 72°C y posterior enfriamiento hasta 4°C.

7.3. Detección e Interpretación de los resultados

Los fragmentos de DNA amplificados fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en 0,5xTBE (50 mM Tris, 50 mM ácido bórico y 0,2 mM EDTA pH8) a 120 voltios durante 60 minutos. El gel fue cargado con 10-20 µl de producto amplificado y un control de peso molecular de 1 kb. Se tiñó con bromuro de etidio durante 30 minutos. La visualización de los amplificados se realizó sobre un transiluminador de luz ultravioleta.

Las cepas que tienen el gen *luk-PV*, presentan una banda de 433 pb en el producto de PCR (Figura 7.1).

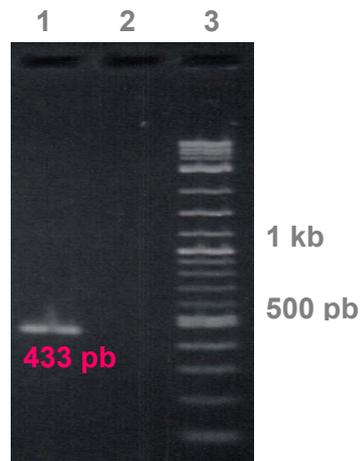


Figura 7.1- Resultado de PCR del gen *Luk-PV*. El carril 1 corresponde al amplificado del gen *Luk-PV* con un tamaño de banda de 433 pb. El carril 2 corresponde a un control negativo. El carril 3 es un control de peso molecular.

1. Resistencia a meticilina de las cepas aisladas en hospitales españoles en el mes de junio de 2003.

1.1. Participación de hospitales en el estudio.

Los hospitales que manifestaron interés en participar en el estudio fueron 71, de los cuales, 64 mandaron cepas y 61 contestaron a la encuesta epidemiológica adjunta. En base a los resultados obtenidos del análisis de ésta última (Rodríguez-Baño, 2006), entre los hospitales participantes, 18 (30%) eran de segundo nivel ó comarcales, 35 (57%) de tercer nivel o generales y 8 (13%) privados; en relación al número de camas: <200 camas, 16 (26%); 200-500, 21 (34%) y >500, 24 (39%).

La distribución geográfica, considerando los 64 hospitales que nos remitieron sus cepas de SARM para el estudio, fue amplia ya que englobaba al menos un representante de casi todas las comunidades autónomas, a excepción de Castilla-León, Navarra y La Rioja (Figura 1.1). Se consideró, por tanto que la representación de hospitales por comunidades y por tamaño había sido amplia y representativa.



Figura 1.1- Localización de los 64 hospitales que remitieron cepas de SARM.

1.2. Cepas incluidas en el estudio. Porcentaje de resistencia a meticilina.

Se recibieron un total de 441 cepas aisladas durante junio de 2003 en 64 hospitales españoles. De éstas, en 424 (96%) fue confirmada su identificación como *S. aureus*, por métodos bioquímicos, y su resistencia a meticilina, por PCR. En las 17 (4%) cepas restantes se encontraron 15 aislamientos de *S. aureus* sensible a meticilina y 2 *Enterococcus sp.* en 2 cepas (Figura 1.2).

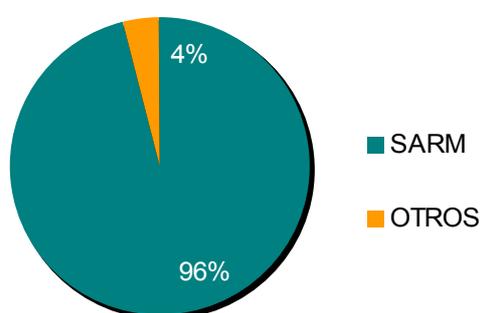


Figura 1.2- Porcentaje de *S. aureus* resistentes a meticilina identificados entre las cepas recibidas.

La resistencia media a meticilina de *S. aureus* entre los hospitales participantes durante el período de junio de 2003 fue del 20%. Este porcentaje fue muy similar, del 21%, al obtenido durante el año 2002 según los datos referidos por los hospitales en la encuesta epidemiológica (Rodríguez-Baño, 2006). Estos datos se obtuvieron de los hospitales que pudieron facilitar el número de pacientes nuevos infectados o colonizados por SARM del total de pacientes infectados o colonizados por *S. aureus* (51 hospitales en 2003 y 43 hospitales en 2002). Para evitar incluir pacientes repetidos, no se incluyeron en este análisis los hospitales que facilitaron solamente el número de cultivos de SARM y de *S.aureus*.

2. Sensibilidad antibiótica y Patrones de resistencia a antibióticos no beta-lactámicos.

2.1. Porcentaje de resistencia antibiótica.

El porcentaje de resistencia a los diferentes antibióticos, estudiados mediante disco difusión, en 424 cepas SARM se muestra en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Porcentaje de resistencia de SARM a antibióticos no beta-lactámicos

% RESISTENCIAS			
ERITROMICINA (ERI)	77	TETRACICLINA (TET)	2
CLINDAMICINA (CLIN)	46	RIFAMPICINA (RIF)	2
GENTAMICINA (GEN)	25	COTRIMOXAZOL (SXT)	2
TOBRAMICINA (TOB)	86	ÁC. FUSÍDICO (FUS)	2
CIPROFLOXACINO (CIP)	99	VANCOMICINA (VAN)	0
MUPIROCINA (MUP)	20	SYNERCID (Q/D)*	0
CLORANFENICOL (CLO)	12	LINEZOLID (LNZ)	0

(*: Quinupristina/Dalfopristina)

El 77% de las cepas SARM recibidas fue resistente a eritromicina y el 46% a clindamicina, considerando conjuntamente la resistencia constitutiva e inducible a este compuesto. Por tanto, un 46% de las cepas mostraron un fenotipo de resistencia MLS_B y un 31% un fenotipo MS_B , estos aspectos son analizados en detalle en el capítulo 4 de resultados.

Casi la totalidad de las cepas estudiadas (420/424) presentan resistencia a ciprofloxacino (99%). La resistencia a gentamicina se detectó en el 25% de las cepas, mientras que el 86% fueron resistentes a tobramicina.

Antibióticos como, tetraciclina, rifampicina, o cotrimoxazol presentan un porcentaje de resistencia muy baja (2%) Entre Los nuevos antimicrobianos utilizados en el tratamiento de las infecciones por SARM, ác. fusídico, Q/D y Linezolid, no se detectaron cepa resistentes.

Dos datos importantes a destacar son la detección de una baja proporción de cepas con heterorresistencia a glucopéptidos y la detección de un 20% de resistencia a mupirocina.

Utilizando placas de cribaje con Muller-Hinton suplementado con 2 µg/ml de vancomicina se obtuvo el crecimiento de 19 de las 424 cepas SARM (4,5%) estudiadas a las 24-48h. Ninguna de estas cepas creció en placas BHI con 6 µg/mL de vancomicina. Las CIMs a vancomicina, estudiadas por E-test, fueron inferior a 2 µg/ml en 13 cepas. Solamente 6 aislamientos (1,4%) presentaron una CIM entre 3 y 4 µg/mL, entre éstos las CIMs a teicoplanina, por E-test, oscilaron entre 2 y 16 µg/mL.

En relación a la resistencia a mupirocina, ésta fue detectada en el 20% de las cepas, concretamente en 86 cepas obtenidas de 35 hospitales. Entre las 84 cepas, 64 (74%) presentaron resistencia de alto nivel (>512 µg/ml) y 22 (26%) resistencia de bajo nivel (8-216 µg/ml).

2.2. Caracterización del patrón de resistencia antibiótica en las cepas SARM.

2.2.1. Patrones de resistencia antibiótica.

El patrón de resistencia (PR) asignado a cada una de las cepas se realizó en función de la resistencia que mostraban a los siguientes antibióticos: eritromicina, clindamicina, gentamicina, tobramicina, tetraciclina, cloranfenicol, cotrimoxazol, rifampicina, vancomicina y ciprofloxacino.

Se estudiaron las 424 cepas SARM y se encontraron 36 PRs distintos cuya composición y frecuencia se muestra en la tabla 2.2. Los PRs se fueron identificando mediante números, de acuerdo a PRs previamente identificados en el Hospital Universitario de Bellvitge.

Tabla 2.2- Patrones de resistencia antibiótica (PR) de las cepas SARM y el porcentaje respecto del total de cepas (n=424)

PR	Composición	Frec.	PR	Composición	Frec.	PR	Composición	Frec.
PR1	Eri Clin Tet Gen Tob Cip Rif	0,23%	PR21	Eri Clor Cip	0,7%	PR49	Eri Tet Tob Cip	0,23%
PR2	Eri Clin Tob Cip	21%	PR23	Eri Clin Clor Gen Tob Cip	1%	PR57	Eri Sxt Tob	0,23%
PR3	Eri Clin Tob	0,23%	PR25	Eri Clin Clor Cip	0,23%	PR58	Eri Clin Sxt Tob Cip	0,7%
PR4	Tob Cip	12%	PR26	Eri Cip	3%	PR59	Eri Clin Sxt Clor Tet Gen Tob Cip Rif	0,23%
PR5	Eri Clin Tet Gen Tob Cip	0,5%	PR27	Tob	0,23%	PR60	Eri Gen Tob Rif Cip	0,5%
PR9	Gen Tob Cip	2%	PR28	Eri Clin Gen Tob Sxt Rif Cip	0,23%	PR61	Gen Tob Rif Cip	0,23%
PR10	Eri Clin Cip	3%	PR30	Cip	6%	PR62	Eri ^l Clin Gen Tob Cip	0,23%
PR12	Sólo resistente a metilicina	0,23%	PR33	Eri Tob Cip	18%	PR63	Eri Sxt Tob Cip	0,23%
PR13	Eri Clin Clor Tob Cip	3%	PR35	Eri Gen Tob Cip	4%	PR64	Eri Clin Sxt Clor Tob Cip	0,23%
PR15	Clor Tob Cip	2%	PR38	Eri Clor Tob Cip	3%	PR65	Eri Tob Rif Cip	0,23%
PR18	Eri Clor Gen Tob Cip	0,7%	PR42	Tet	0,23%	PR67	Eri Clin Sxt Clor Gen Tob Cip	0,23%
PR20	Eri Clin Gen Tob Cip	15%	PR48	Eri Clin Gen Tob Cip Rif	0,23%	PR68	Clor Tob Tet Cip	0,23%

(Eri: Eritromicina; Clin: Clindamicina; Tet: Tetraciclina; Gen: Gentamicina; Tob: Tobramicina; Sxt: Cotrimoxazol; Cip: Ciprofloxacina; Rif: Rifampicina; Mup: Mupirocina; Clor: Cloranfenicol)

La frecuencia con la que se encuentran estos PRs es variable (Tabla 2.3) (Figura 2.2):

- En 23 PRs el número de aislamientos era inferior a 5: los PRs 18, 21 y 58 contenían 3 cepas cada uno; los PRs 5 y 60, 2 cepas; y los PRs 1, 3, 12, 25, 27, 28, 42, 48, 49, 57, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 67, y 68 solamente una cepa. En este grupo se encontraban 31 aislamientos, lo que representaba el 7% del total.

- En 7 PRs el número de aislamientos oscilaba entre 5 y 15: el PR26 contenía 14 cepas; el PR10, 13; el PR38, 12; el PR13, 11; los PRs 9 y 15 contenían 8 aislamientos cada uno y el PR23, 5 aislamientos. En este grupo se encontraban 71 cepas, el 17% del total.

- En 6 PRs el número de aislamientos era superior a 15: el PR2, contenía 90 cepas; el PR33, 74; el PR20, 62; el PR4, 53; el PR 30, 24 y PR35, 19. En este grupo se encontraban 322 cepas, que representaban el 76% del total.

Tabla 2.3.- Número de aislamientos que presentan cada uno de los patrones de resistencia antibiótica (PR).

Nº Aislamientos		PRs
< 5 (n= 31) (7%)	1	1, 3, 12, 25, 27, 28, 42, 48, 49, 57, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 68
	2	5, 60
	3	18, 21, 58
5-15 (n= 71) (17%)	5	23
	8	9, 15
	11	13
	12	38
	13	10
	14	26
	19	35
> 15 (n= 322) (76%)	24	30
	53	4
	62	20
	74	33
	90	2

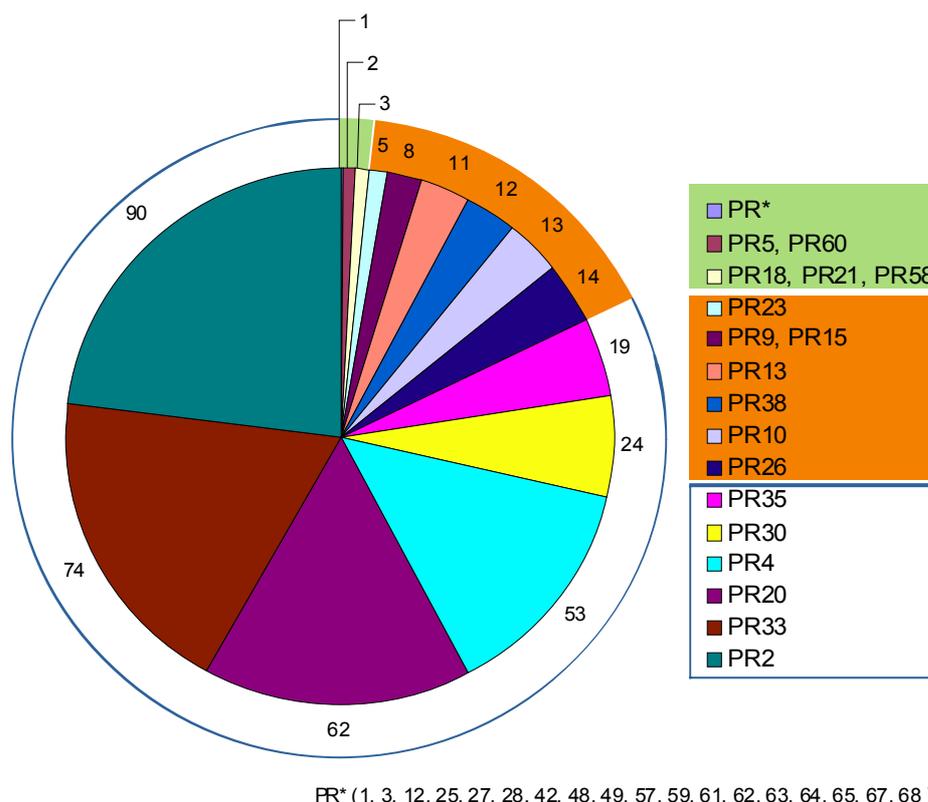


Figura 2.2.- Representación gráfica de los patrones de resistencia antibiótica (PR) en función de su número de aislamientos.

Definiendo la multirresistencia antibiótica como resistencia a 4 o más grupos de antibióticos. Ésta se encuentra asociada a un número de 16 PRs (PR1, 5, 13, 18, 23, 28, 48, 49, 58, 59, 60, 63, 64, 65, 67, 68) sin embargo, el número total de aislamientos incluidos es pequeño, 36 (8%), la mayoría de estos PRs se corresponden con PRs aislados que presentan aislamientos únicos. Es destacable el PR1 (sensible únicamente a cloranfenicol, cotrimoxazol, vancomicina, teicoplanina y mupirocina), asignado inicialmente al denominado Clon Ibérico (Dominguez, 1994) y que tuvo una elevada prevalencia en España durante los años 90. En este estudio sólo se ha encontrado una cepa con este perfil, en el Hospital Nacional de Parapléjicos.

Los PRs a los que pertenecen el mayor número de cepas, aunque contienen resistencia a distintos grupos antibióticos ésta no supera el número de 3. Los PRs 2, 4 y 33 mantienen resistencia a tobramicina y ciprofloxacino, combinada con eritromicina y/o clindamicina. Los PRs 20 y 35 son destacables puesto que al patrón de resistencia anterior incorporan la resistencia a gentamicina, y son realmente los responsables de la resistencia global a este antibiótico; por último el PR30, solo muestra resistencia a ciprofloxacino.

Las cepas que presentan heterorresistencia a glucopéptidos se asocian con 5 PRs: PR2 contiene 2 cepas y los PRs 20, 30, 33 y 60 con una cepa cada uno.

Las 84 cepas que presentan resistencia a mupirocina se encuentran asociadas con 18 PRs (Figura 2.3): el PR20 contiene 31 cepas; PR35, 13; PR2, 9; PR33, 6; PR9, 5; los PRs 4, 18 y 23, 3 cepas cada uno, el PR10 2 y los PRs 13, 15, 26, 30, 48, 60, 61, 62 y 63, contienen una cepa cada uno.

Dentro de la resistencia a mupirocina, las cepas que presentan resistencia de bajo nivel se asocian con 7 PRs: PR20, 12 cepas; PR 2, 4; PR 33, 2 cepas y los PRs 15, 23, 48 y 4 contienen una cepa cada uno.

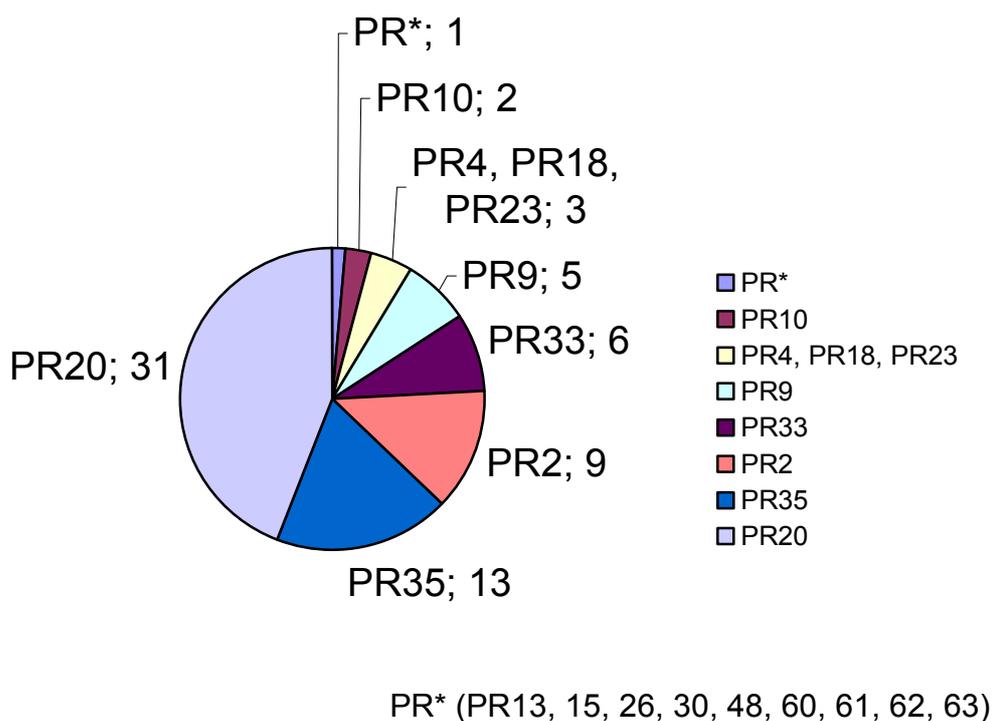


Figura 2.3.- Representación gráfica de los PRs con resistencia a mupirocina y el número de cepas que contienen cada uno de ellos.

2.2.2. Estudio de los patrones de resistencia en relación con los hospitales.

Para evaluar la dispersión de los PRs en los diversos hospitales, inicialmente se subdividió en dos bloques, aquellos que correspondían a los valores obtenidos de 15 hospitales con 10 ó más aislamientos, de los que se obtuvieron 206 cepas; y el formado por el resto de hospitales que correspondían a los que proporcionaron un bajo número de cepas.

A) Hospitales con 10 ó más aislamientos SARM

En la tabla 2.4 se puede observar la frecuencia que presentan los patrones de resistencia en relación con los diferentes hospitales.

Tabla 2.4- Relación entre los 15 hospitales con ≥ 10 cepas y los patrones de resistencia asociados.

Hospitales	Patrones de Resistencia (PRs)					Total cepas enviadas
	2 <i>Eri Cli Tob Cip</i>	4 <i>Tob Cip</i>	20 <i>Er Cl Gen Tob Cip</i>	33 Er Tob Cip	OTROS	
HRYC	1	1	1	6 (46%)	4	13
HGM	2	-	16 (61%)	2	6	26
HCPH	1	1	1	6 (46%)	4	13
HUMS	2	2	4	-	2	10
HVS	-	1	10 (56%)	4	3	18
HVH	2	5 (36%)	-	-	7	14
HC	-	1	1	1	11 (79%)	14
HM	6 (50%)	1	1	-	4	12
HI	2	1	-	-	8 (73%)	11
HUB	-	1	2	5 (33%)	7	15
CHUS	9 (75%)	1	1	1	-	12
HXL	2	-	2	3	4	11
HSP	4	6 (40%)	-	1	4	15
HSD	3	1	2	-	6	12
H. Clínico	4	1	-	3	2	10

(HRYC: Hospital Ramón y Cajal; HGM: Hospital Gregorio Marañón; HCPH: Hospital Clínico Puerta del Hierro; HUMS: Hospital Universitario Miguel Server; HVS: Hospital Virgen de la Salud; HVH: Hospital Vall d'Hebron; HC: Hospital de Cruces; HM: Hospital del Mar; HI: Hospital Insular de Gran Canaria; HUB: Hospital Universitario de Bellvitge; CHUS: Complejo Hospitalario Universitario de Santiago; HXL: Hospital Xeral de Lugo; HSP: Hospital de San Pau; HSD: Hospital de Son Dureta; H. Clínico: Hospital Clínico de Barcelona)

En dicha tabla destaca la variabilidad de patrones de resistencia que se encuentran en los diferentes hospitales. Aún así, al analizar los datos podemos ver como el PR2 es más frecuente en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (75% de las cepas) y en el hospital del Mar (50%); el PR4 se encuentra con más frecuencia en el hospital de San Pau (40%) y en el hospital de Vall d'Hebron (36%); el PR 20 es más prevalente en el hospital Gregorio Marañón (61%) y en el hospital Virgen de la Salud (56%); y el PR33 comparte su frecuencia entre el hospital Ramón y Cajal (46%), el hospital Clínico Puerta del Hierro (46%), y el hospital Universitario de Bellvitge (33%). Por el contrario, estos PRs se aíslan con poca frecuencia en el hospital de Cruces y en el hospital Insular de Gran Canaria, donde son más frecuentes "Otros" patrones de resistencia.

La representación gráfica de los datos porcentuales de los patrones de resistencia antibiótica en los hospitales con ≥ 10 cepas (Figura 2.4), muestra que los patrones de resistencia PR2, PR4, PR20 y PR33 son los de mayor frecuencia (18%, 11%, 20% y 16%, respectivamente)

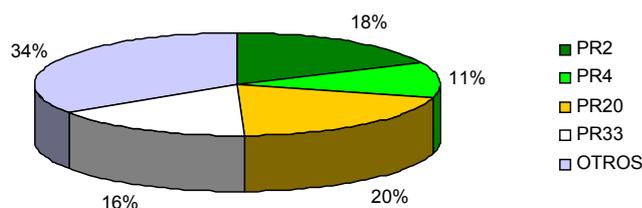


Figura 2.4- Patrones de resistencia antibiótica de los hospitales con ≥ 10 cepas y su porcentaje en relación al total de cepas (n=206).

B) Hospitales con menor número de aislamientos SARM

Durante el período de estudio 49 hospitales tuvieron entre 1 y 9 aislamientos SARM con un total de 218 cepas. La frecuencia de PRs fue similar

a la de los hospitales con 10 o más aislamientos. Así tenemos que los PRs más frecuentes fueron el PR2, PR4, PR20 y PR33 con una frecuencia de 23%, 13%, 10% y 18%, respectivamente. El grupo formado por “Otros” PRs presentaba una frecuencia del 36%.

C) Análisis global

El análisis del total de hospitales participantes y su relación con los patrones de resistencia antibiótica (Figura 2.5), muestra que los patrones de resistencia PR2, PR4, PR20 y PR33 se encuentran en mayor número de cepas y de hospitales. Así, el PR2 está en 90 cepas de 40 hospitales, el PR4 en 53 cepas de 33 hospitales, el PR20 en 62 cepas de 26 hospitales y el PR33 en 74 cepas de 31 hospitales. “Otros” PRs corresponden a 145 cepas de 111 hospitales.

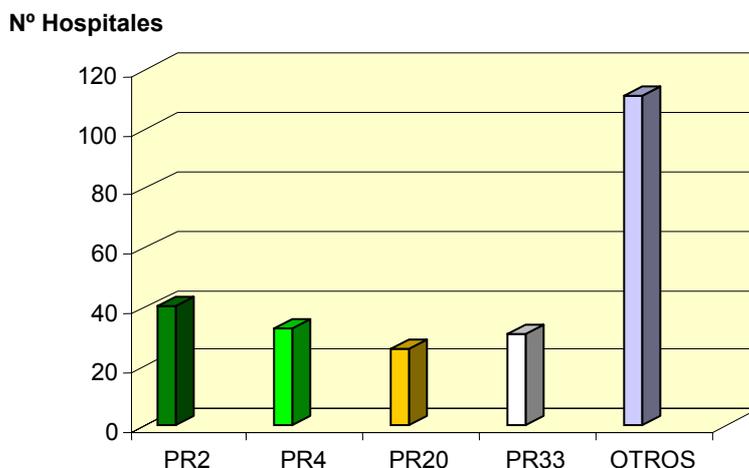


Figura 2.5- Número de hospitales que tienen los patrones de resistencia antibiótica más frecuentes.

La representación gráfica de los datos porcentuales de los diferentes patrones de resistencia antibiótica con respecto al total de cepas ($n = 424$) (Figura 2.6), muestra que, al igual que pasaba con los dos bloques anteriores,

los patrones de resistencia que se encuentran con más frecuencia son el PR2, PR4, PR20 y PR33 (21%, 12%, 15% y 18%, respectivamente).

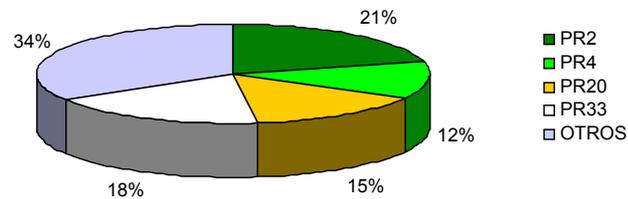


Figura 2.6- Frecuencia de los patrones de resistencia antibiótica en los 64 hospitales incluidos en el estudio (424 aislamientos).

2.2.3. Distribución geográfica.

En este apartado se analizan los diferentes patrones de resistencia antibiótica (tabla 2.7) en relación con su distribución geográfica (figura 2.5)

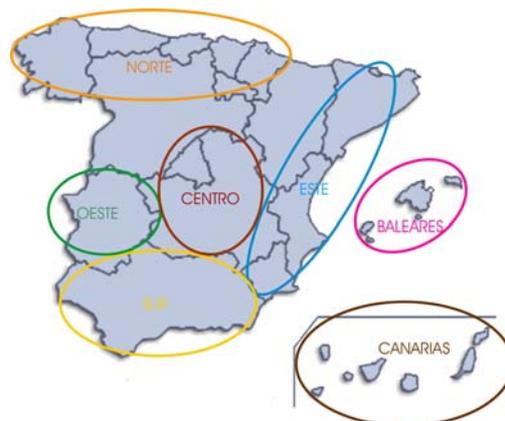


Figura 2.7.- Representación de las diferentes zonas geográficas de España (Norte, Sur, Este, Oeste, Centro, Baleares y Canarias).

Tabla 2.5- Distribución de los patrones de resistencia antibiótica en las diferentes zonas geográficas de España.

	PR	Nº Cepas		PR	Nº Cepas
Norte	2	18*	Oeste	2	1
	33	16		20	33
	30	13	Centro	33	25
	20	8		2	8
	Otros (13 PRs ≠)	22	Otros	27	
			(12 PRs ≠)		
Este	2	43		2	3
	4	30		10	3
	33	25	I. Baleares	30	3
	20	16	Otros	3	
	26	10	(2 PRs ≠)		
	30	7		2	11
Otros (17 PRs ≠)	45		4	4	
Sur	2	7		20	3
	4	7	I. Canarias	33	3
	Otros	7	Otros	7	
	(6 PRs ≠)		(5 PRs ≠)		

(*) Las 18 cepas pertenecientes al PR2 se encuentran en la comunidad gallega.

Los patrones más frecuentes siguen siendo el PR2, PR33, PR20 y PR4 y la distribución de los patrones de resistencia no es predominante en ninguna de las zonas geográficas estudiadas. Resultados similares son los presentados en el estudio VIRA 2004 (Picazo, 2005).

3. Caracterización genotípica de las cepas SARM estudiadas mediante electroforesis en campo pulsátil, MLST y SCCmec.

3.1. Caracterización genotípica mediante electroforesis en campo pulsátil.

El análisis genotípico mediante ECP se realizó en las 424 cepas SARM. El DNA de cada una de las cepas fue digerido con el enzima de restricción *SmaI*, generándose perfiles de restricción con un número de fragmentos de DNA entre 10 y 20. El análisis comparativo de estos perfiles proporcionó 40 genotipos o patrones de ECP diferentes, que se identificaron por letras mayúsculas siguiendo una nomenclatura implantada previamente en el Hospital de Bellvitge. Se consideraron cepas con el mismo genotipo aquellas cuyos perfiles presentaron igual número y tamaño de bandas.

La mayor parte de las cepas (n = 311; 73%) se agruparon en dos patrones predominantes, denominados P y Q. Otros patrones encontrados en menor frecuencia lo formaron un grupo de 38 genotipos diferentes (n = 113; 27%) (Figura 3.1). El genotipo Q fue el más frecuente (40%), seguido del genotipo P (33%). Dentro del grupo "Otros", el más frecuente fue el genotipo BA (8%), el resto de los genotipos aparecieron con una frecuencia <2%.

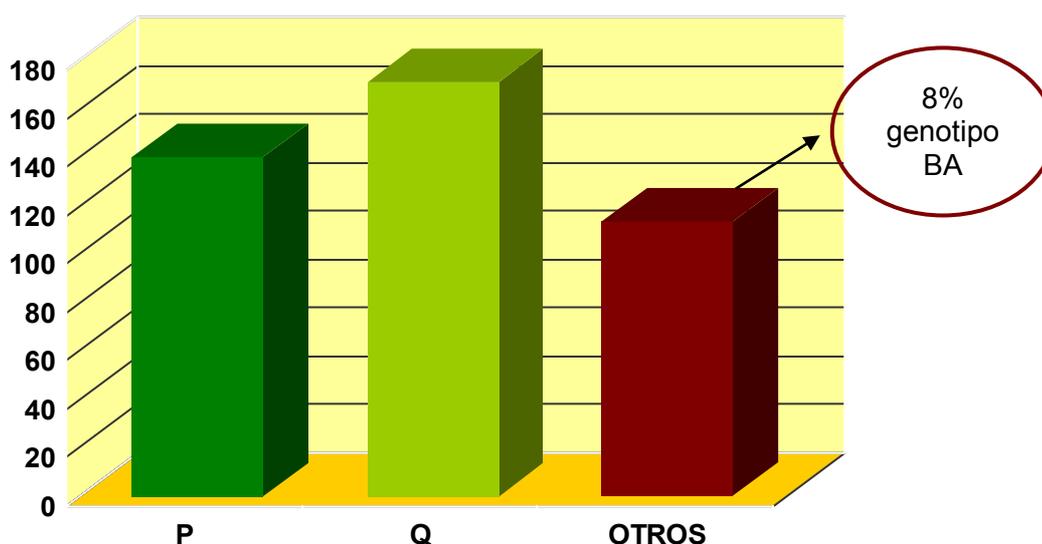


Figura 3.1- Número de cepas y porcentaje de los genotipos que caracterizan a las cepas SARM (140 cepas del clon P, 171 cepas del clon Q y 113 cepas del conjunto de "otros" clones. Los genotipos P y Q comportan el 73% de todas las cepas).

Algunos de los genotipos presentaron subtipos, denominados así a los patrones de bandas que diferían en 3 ó menos fragmentos respecto del genotipo común. Así por ejemplo en el genotipo P se han identificado 9 subtipos (P₁, P₂, P₅, P₈, P₉, P₁₃, P₁₅, P₁₉ y P₂₀), en el genotipo Q, 9 subtipos (Q₁, Q₂, Q₃, Q₄, Q₅, Q₆, Q₇, Q₈ y Q₁₀), en el genotipo BA se identificaron los subtipos BA₁, BA₂ y BA₃. Los subtipos se consideran variaciones genéticas muy próximas entre sí que podrían corresponderse con variantes evolutivas de los aislamientos de un mismo clon.

El número de cepas pertenecientes a cada tipo y subtipo de ECP, así como el porcentaje que representan respecto del total de aislamientos estudiados, figuran en la tabla 3.1

Tabla 3.1- Tipos de ECP y subtipos detectados.

Tipo ECP	Subtipo	Nº Cepas (%)
A (n=1) (%)	1	1
B (n=1) (%)	1	1
P (n=140) (%)	1	37
	2	13
	5	46
	8	11
	9	7
	13	3
	15	20
	19	2
	20	1
Q (n=171) (%)	1	104
	2	43
	3	2
	4	13
	5	3
	6	1
	7	1
	8	3
	10	1

Tipo ECP	Subtipo	Nº Cepas (%)
AM (n=4) (%)	1	3
	2	1
BA (n=35) (%)	1	20
	2	2
	3	13
BB (n=2) (%)	1	1
	2	1
BE (n=7) (%)	2	4
	3	3
BH (n=8) (%)	1	1
	2	4
	3	3

En la tabla 3.2 figuran los tipos de ECP que no presentaron subtipos, así como el número de cepas pertenecientes y el porcentaje que representan respecto del total de aislamientos estudiados

Tabla 3.2- Tipos de ECP que no presentaron subtipos.

Tipos de ECP sin subtipos	Nº Cepas (%)	Tipos de ECP sin subtipos	Nº Cepas (%)
<i>BC</i>	5	<i>BU</i>	1
<i>BD</i>	4	<i>BV</i>	1
<i>BF</i>	2	<i>BW</i>	1
<i>BG</i>	4	<i>BX</i>	2
<i>BI</i>	1	<i>BY</i>	2
<i>BJ</i>	6	<i>BZ</i>	1
<i>BK</i>	1	<i>CA</i>	1
<i>BL</i>	1	<i>CB</i>	1
<i>BM</i>	2	<i>CC</i>	1
<i>BN</i>	1	<i>CD</i>	1
<i>BO</i>	1	<i>CE</i>	3
<i>BP</i>	1	<i>CF</i>	1
<i>BQ</i>	2	<i>CG</i>	2
<i>BR</i>	2	<i>CH</i>	1
<i>BS</i>	1	<i>CI</i>	1
<i>BT</i>	1		

Al analizar la relación genética entre las cepas aplicando el coeficiente de similitud de Dice, los índices obtenidos entre la distancia genética de los subtipos de un mismo genotipo siempre fueron >88%. La distancia genética entre los genotipos P y Q es del 80%, siendo el índice de Dice <66% cuando se comparan con otros genotipos, lo cual indicaría que los clones P y Q se encuentran muy próximos entre sí. Este hecho también lo encontramos al analizar los perfiles de ECP en el que observamos que los clones P y Q tienen variaciones sólo entre 4 y 8 bandas (Figura 3.2).



Figura 3.2- Patrones de bandas de los clones P y Q con algunos de los subtipos. (CPM: control de peso molecular -*Lambda ladder*, New England Biolabs-). (Kb, kilobases).

El genotipo BA, se corresponde con el denominado clon EMRSA-16 (*Epidemic Methicillin Resistant S. aureus -16*), descrito inicialmente en el Reino Unido (Cox, 1995) y actualmente considerado como un clon pandémico (Oliveira, 2002) (Figura 3.3).

También cabe destacar el genotipo BE que a pesar de ser poco frecuente (1,6%), se corresponde con el clon británico EMRSA-15 (Cox, 1995) (*Epidemic Methicillin Resistant S. aureus -15*) (Figura 3.3).

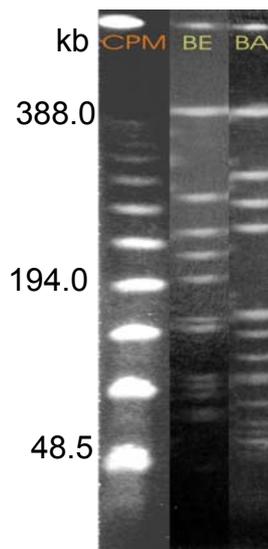


Figura 3.3- Patrones de bandas de los clones BA - EMRSA16 y BE - EMRSA15. (CPM: control de peso molecular -*Lambda ladder*, New England Biolabs-). (kb, kilobases)

3.1.1. Relación entre genotipos y patrones de resistencia antibiótica

Los dos clones dominantes, P y Q, presentaron una expresión de la resistencia antibiótica variable y se encontraron distribuidos entre un gran número de PRs, siendo más frecuentes entre los seis PRs principales (PR2, PR4, PR20, PR30, PR33 y PR35). El resto de clones se encuentran distribuidos entre los 36 PRs diferentes sin un claro predominio, a excepción del genotipo BA en el que el 57% de las cepas se corresponden con el PR2. En la tabla 3.3 se muestra la relación entre los genotipos más frecuentes obtenidos mediante electroforesis en campo pulsátil y los patrones de resistencia antibiótica correspondientes.

Tabla 3.3- Genotipos más frecuentes y sus patrones de resistencia antibiótica correspondientes.

	PR2 ErClTo Cip	PR4 ToCip	PR20 ErClGeTo Cip	PR26 ErCip	PR30 Cip	PR33 ErTob Cip	PR35 ErGeTob Cip	PR38 ErCloTo bCip	Otros PRs	Total
Clon P	41 (29%)	31 (22%)	19 (14%)	1	12 (9%)	14 (10%)	4	2	16	140
Clon Q	20 (12%)	16 (9%)	18 (10%)	13 (8%)	6	51 (30%)	12	9	26	171
Clon BA	20 (57%)	-	6	-	-	1	1	-	7	35
Otros Clones	9	6	19	-	6	8	2	1	27	78

(Los porcentajes expresan la proporción de cepas de cada genotipo al que le corresponde un PR determinado)

A pesar de la diversidad de expresión de la resistencia antibiótica en los clones dominantes, el clon P se encontró con mayor frecuencia asociado al PR2, PR4 y al PR20. El clon Q se asociaba más frecuentemente con el PR33, seguido del PR2 y PR20. Por otro lado, más de la mitad de las cepas del clon BA se correspondían con el PR2.

En la tabla 3.4 se exponen los patrones de resistencia hallados en el estudio y sus genotipos asociados. En general, el genotipo P se manifestó asociado a 19 PR distintos y el genotipo Q a 21, muchos de estos PR fueron compartidos por ambos clones. En relación al fenotipo de resistencia a macrólidos, como se analizará más adelante, el fenotipo MLS_B se asociaba con mayor frecuencia al clon P, mientras que el fenotipo MS_B lo hacía mayoritariamente con el genotipo Q (sobretudo en los PRs 26, 33, 35 ó 38).

Por último, destacar que:

- de los 23 PR con menor número de cepas (<5), 11 se corresponden también con genotipos únicos

- de los 16 PRs multirresistentes: el clon Q estaba en 8 PRs (PR13, PR18, PR23, PR28, PR49, PR58 y PR60, PR63) correspondiente a 17 cepas; el clon P en 5 PRs (PR13, PR23, PR48, PR65 y PR68) correspondiente a 6 cepas; el clon BA en 4 PRs (PR13, PR58, PR64 y PR67) correspondiente a 6 cepas; y un total de 7 clones diferentes, en 6 PRs (PR1, PR5, PR13, PR23, PR59 y PR60) con una cepa cada uno.

Tabla 3.4- Patrones de resistencia antibiótica y sus genotipos correspondientes.

PR	P	Q	BA	OTROS clones	Total	PR	P	Q	BA	OTROS clones	Total
PR1	-	-	-	1	1	PR30	12 (50%)	6 (25%)	-	6 (25%)	24
PR2	41 (46%)	20 (22%)	20 (22%)	9 (10%)	90	PR33	14 (19%)	51 (69%)	1 (1%)	8 (11%)	74
PR3	1	-	-	-	1	PR35	4 (21%)	12 (63%)	1 (5%)	2 (10%)	19
PR4	31 (58%)	16 (30%)	-	6 (12%)	53	PR38	2 (17%)	9 (75%)	-	1 (8%)	12
PR5	-	-	-	2	2	PR42	-	-	-	1	1
PR9	3	1	-	4	8	PR48	1	-	-	-	1
PR10	2 (15%)	4 (31%)	1 (7%)	6 (50%)	13	PR49	-	1	-	-	1
PR12	-	-	-	1	1	PR57	-	1	-	-	1
PR13	2 (18%)	6 (55%)	2 (18%)	1 (9%)	11	PR58	-	1	2	2	5
PR15	2	-	-	6	8	PR59	-	-	-	1	1
PR18	-	3	-	-	3	PR60	-	1	-	1	2
PR20	19 (31%)	18 (29%)	6 (10%)	19 (31%)	62	PR61	-	-	-	1	1
PR21	-	3	-	-	3	PR62	-	-	-	1	1
PR23	1	3	-	1	5	PR63	-	1	-	-	1
PR25	1	-	-	-	1	PR64	-	-	1	1	2
PR26	1	13 (93%)	-	-	14	PR65	1	-	-	-	1
PR27	1	-	-	-	1	PR67	-	-	1	1	2
PR28	-	1	-	-	1	PR68	1	-	-	-	1

Los datos anteriores se representan de forma gráfica en la figura 3.4.

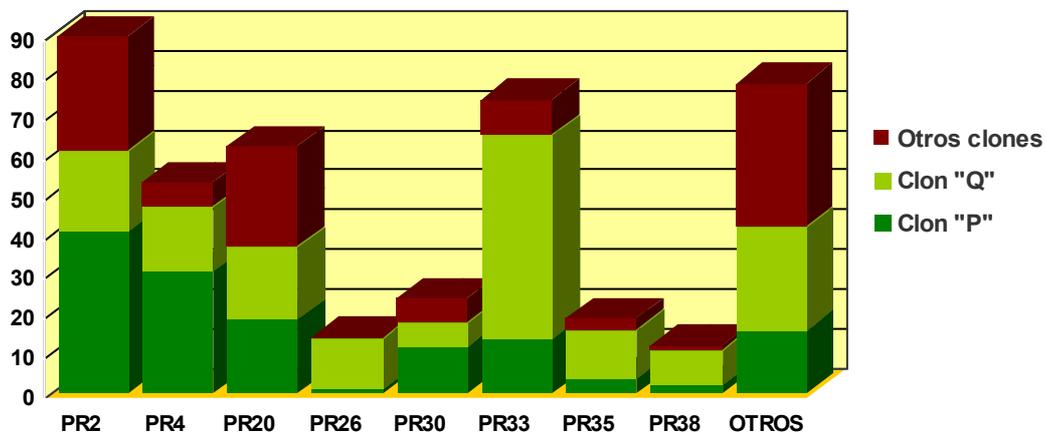


Figura 3.4- Patrones de resistencia más frecuentes y su relación con los genotipos.

3.1.2. Estudio de los patrones genotípicos en relación con los hospitales.

A) Hospitales con 10 ó más aislamientos SARM

En la siguiente tabla 3.5 se puede observar la frecuencia en la que se encuentran los patrones genotípicos en dichos hospitales.

Tabla 3.5- Relación entre los 15 hospitales que tienen ≥ 10 cepas y los genotipos más frecuentes.

Hospitales	Genotipos				Total cepas enviadas
	P	Q	BA	OTROS	
HRYC	3	9 (60%)	-	1	13
HGM	2	16 (61%)	-	8 (31%)	26
HCPH	3	8 (61%)	-	2	13
HUMS	2	8 (80%)	-	-	10
HVS	14 (78%)	3	-	1	18
HVH	8 (57%)	5	-	1	14
HC	7	6	-	1	14
HM	5	7	-	-	12
HI	5	3	-	3	11
HUB	5	6	-	4	15
CHUS	1	3	7 (58%)	1	12
HXL	1	3	7 (63%)	-	11
HSP	10 (66%)	3	-	2	15
HSD	4	2	-	6 (50%)	12
H. Clínico	2	8 (80%)	-	-	10

(HRYC: Hospital Ramón y Cajal; HGM: Hospital Gregorio Marañón; HCPH: Hospital Clínico Puerta del Hierro; HUMS: Hospital Universitario Miguel Servet; HVS: Hospital Virgen de la Salud; HVH: Hospital Vall d'Hebron; HC: Hospital de Cruces; HM: Hospital del Mar; HI: Hospital Insular de Gran Canaria; HUB: Hospital Universitario de Bellvitge; CHUS: Complejo Hospitalario Universitario de Santiago; HXL: Hospital Xeral de Lugo; HSP: Hospital de San Pau; HSD: Hospital de Son Dureta; H. Clínico: Hospital Clínico de Barcelona)

En esta tabla cabe destacar que, de nuevo, los genotipos más frecuentes son P y Q y están en mayor proporción en la mayoría de los

hospitales. Así, el clon P es más frecuente en el hospital Virgen de la Salud (78%), seguido del hospital de S. Pau (66%) y el hospital de Vall d'Hebron (57%). El clon Q se encuentra más frecuentemente en el hospital Clínico y hospital Universitario Miguel Servet (80% ambos), seguido de los hospitales Gregorio Marañón y el hospital Clínico Puerta del Hierro (61% cada uno) y en el hospital Ramón y Cajal (60%).

En el hospital Xeral de Lugo y en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago los genotipos P y Q se encuentran en un pequeño porcentaje, siendo el clon BA el más dominante con un 63% y un 58% de frecuencia respectivamente.

Si representamos gráficamente los datos porcentuales de las cepas que tienen los genotipos en los hospitales con ≥ 10 cepas (Figura 3.5), podemos observar como los genotipos más frecuentes son el clon P (43%) y el clon Q (35%), siendo el clon BA el más frecuente, 7%, dentro del grupo "Otros" clones.

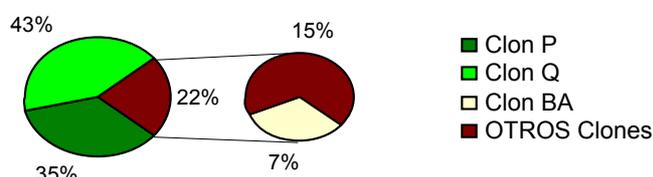


Figura 3.5- Patrones genotípicos de los hospitales con ≥ 10 cepas y su porcentaje en relación a su total de cepas (n=206).

B) Hospitales con menor número de aislamientos SARM

La frecuencia que presentaban los diferentes genotipos fue similar a la de los hospitales con 10 o más aislamientos. Los clones más frecuentes fueron el clon Q, 37%, y el clon P, 31% seguidos del clon BA, 10%. El grupo formado por "Otros" clones presentaba una frecuencia del 22%.

C) Análisis global

El análisis del total de hospitales participantes y su relación con los distintos patrones genotípicos (Figura 3.6), muestra que los clones P y Q, y en tercer lugar el clon BA, se encuentran en mayor número de cepas y hospitales. Así, el genotipo P está en 140 cepas de 50 hospitales, el genotipo Q en 171 cepas de 50 hospitales y el genotipo BA en 35 cepas de 13 hospitales. Otros genotipos corresponden a 78 cepas de 55 hospitales.

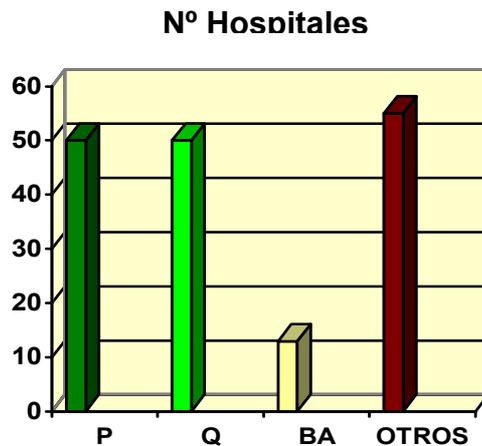


Figura 3.6- Número de hospitales que tienen distintos patrones genotípicos.

Si representamos gráficamente los porcentajes de los diferentes patrones genotípicos en relación al total de cepas ($n = 424$), obtenemos que la frecuencia de los patrones genotípicos sigue siendo mayoritaria para los clones P y Q seguidos del clon BA, siendo estos datos similares a los obtenidos en los dos bloques anteriores(Figura 3.7).

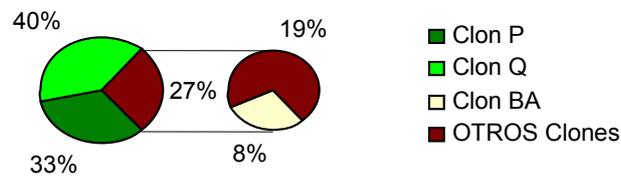


Figura 3.7- Frecuencia de los genotipos en relación al total de cepas SARM (n= 424).

3.1.3. Distribución geográfica

En la tabla 3.6. se muestran los distintos genotipos en relación con su distribución geográfica (figura 3.8)



Figura 3.8- Representación de las diferentes zonas geográficas de España (Norte, Sur, Este, Oeste, Centro, Baleares y Canarias).

Tabla 3.6- Distribución de los clones en las diferentes zonas geográficas de España, ordenados de forma decreciente en función del número de cepas.

	CLON	Nº Cepas		CLON	Nº Cepas
Norte	Q	44	Centro	Q	48
	BA	21*		P	27
	P	19		BA	1
	BE	1		B	1
	Otros	11		Otros	15
	(8 clones ≠)			(11 clones ≠)	
Este	Q	76	I. Baleares	BE	6
	P	66		P	4
	Otros	34		Q	2
	(16 clones ≠)				
Sur	P	14	I. Canarias	BA	9
	Q	6		P	7
	BA	1		Q	4
Oeste				Otros	9
	P	1		(7 clones ≠)	

(*) Las 21 cepas del clon BA se encuentran a la comunidad gallega.

En cada una de las regiones geográficas encontramos una gran variabilidad de patrones genotípicos aunque en la mayoría de ellas los clones más frecuentes son el clon Q y el clon P.

Necesitan una mención especial de localización, aquellos patrones genotípicos que se corresponden con clones epidémicos internacionales. Así, el genotipo BA que se corresponde con el clon epidémico EMRSA-16 predomina en el norte, concretamente en la Comunidad Gallega. Este clon está presente en 35 cepas distribuidas por 13 hospitales españoles de los cuales, 7 pertenecen a la Comunidad Gallega con un total de 22 cepas (63%), y 2 son hospitales de canarias con 9 cepas (26%), las 4 cepas restantes pertenecen a 4 hospitales distribuidos por distintas regiones (Madrid, Valencia, Alicante y Sevilla).

El genotipo BE similar al clon epidémico EMRSA-15 se encuentra sobre todo en las islas Baleares. Está presente en 7 cepas (1,6%), 6 cepas

pertenecen a las islas Baleares (Hospital de Son Dureta) y 1 cepa al principado de Asturias.

El genotipo B similar al clon Ibérico se ha encontrado en una única cepa en la zona centro de España, perteneciente al hospital Nacional de Parapléjicos en Toledo.

3.2. Caracterización genotípica mediante *Multilocus Sequence typing* (MLST)

El análisis genotípico mediante MLST se realizó en una muestra de 19 cepas seleccionadas en función de los clones más frecuentes y de aquellas cepas que mediante el estudio por ECP estaban relacionadas con clones pandémicos. Los resultados aparecen reflejados en la tabla 3.7., en la que se exponen los alelos correspondientes a cada uno de los genes estudiados y el perfil alélico final (*sequence type* o ST) al que corresponden. Los datos obtenidos ayudaron a establecer la evolución y las relaciones genéticas existentes entre los aislamientos estudiados

Tabla 3.7.- Perfil alélico de 19 cepas de SARM de distintos genotipos con su patrón de resistencia antibiótica (PR).

Clon	PR	arcC	aroE	glpF	gmK	pta_	tpi_	yqiL	ST
P.2	4	1	43	1	4	12	1	10	ST146
P.19	4	1	43	1	4	12	1	10	ST146
P.5	48	1	4	1	4	12	1	54	ST125
P.8	4	1	4	1	4	12	1	54	ST125
P.15	26	1	4	1	4	12	1	54	ST125
P.20	20	1	4	1	4	12	24	29	ST228
Q.1	33	1	4	1	4	12	1	54	ST125
Q.5	4	1	4	1	4	12	1	54	ST125
Q.8	4	1	4	1	4	12	1	54	ST125
Q.2	26	1	4	1	4	12	1	54	ST125
Q.3	2	1	4	1	4	12	1	10	ST5
Q.4	20	1	4	1	4	12	24	29	ST228
BE.2	10	7	6	1	5	8	8	6	ST22
BA.1	20	2	2	2	2	3	3	2	ST36
BG	42	3	3	1	1	4	4	3	ST8
B.1	1	3	3	1	12	4	4	16	ST247
AM	20	1	4	1	4	12	24	29	ST228
A.1	2	3	3	1	1	4	4	3	ST8
BH.2	20	1	4	1	4	12	24	29	ST228

Todos los perfiles alélicos obtenidos y sus alelos correspondientes estaban ya descritos en la página www.mlst.net.

Perfiles alélicos de los genotipos P y Q (tabla 3.7.): aunque considerados genotipos independientes por ECP, los aislamientos estudiados compartieron los resultados del análisis por MLST. El perfil alélico ST125 fue el más frecuentemente hallado tanto entre las cepas del genotipo P (3/6) como entre las del genotipo Q (4/6). Perfiles relacionados con éste, con cambio en uno ó como máximo en dos alelos, fueron encontrados indistintamente en ambos genotipos. ST125 y ST146, son variantes del perfil alélico ST5 correspondiente al denominado clon pediátrico y al clon Nueva York/Japón, ya que sólo difieren en un único alelo, *YqiL* y *aroE* respectivamente, por lo que se

denominan *Single Locus Variant* (SLV). En la base de datos disponible en www.mlst.net sobre *S.aureus*, ST125 está asociado a 6 aislamientos de SARM, de los cuales 4 se describieron en España (Tenerife) y los dos restantes en Noruega y Finlandia. ST146, sólo está descrito en 4 cepas SARM, todas ellas aisladas en España.

ST228 es un *Double Locus Variant* (DLV) de ST5 difiriendo en los alelos *tpi* y *YqiL*, este perfil alélico aparece asociado a un patrón de multirresistencia, PR20 (Er-Clin-Gen.Tob-Cip), presente en distintos genotipos estudiados (P, Q, AM, BH), y tiene múltiples cepas descritas en la base de datos de www.mlst.net en distintos países europeos.

La similitud entre los perfiles alélicos encontrados entre las cepas de los genotipos P y Q, acortan su distancia genética. Por otro lado su relación con el ST5, correspondiente al clon pediátrico y al Nueva York/Japón, indica que su origen genético pudiera derivar de uno de ellos, especialmente del primero, clon pediátrico, con quien comparte estructura de SCCmec (tipo IV) y un patrón de bandas por ECP muy parecido (Figura 3.9)

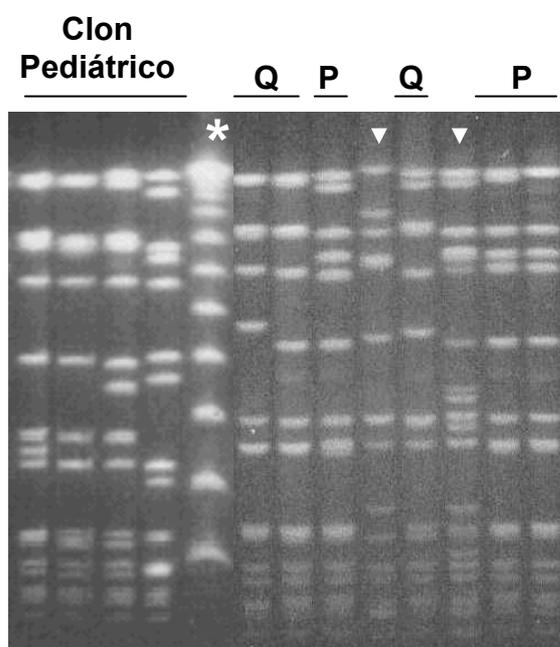


Figura 3.9.- Perfiles de ECP de cepas representantes del Clon Pediátrico (controles cedidos por la Dra. H. De Lencastre) y de cepas de los genotipos P y Q. Los triángulos muestran cepas de genotipos distintos al P-Q. El asterisco muestra un control de peso molecular (*Lambda ladder*, New England Biolabs).

Perfiles alélicos de otros genotipos (tabla 3.7.): ST22 y ST36 corresponden a los clones británicos denominados EMRSA-15 y EMRSA-16, respectivamente, identificados en nuestro estudio como genotipos BA y BE respectivamente. ST247 corresponde al clon Ibérico, clon B, asociado a un perfil de mutirresistencia antibiótica característico, PR1 (Eri-Clin-Tet-Gen-Tob-Cip-Rif). Del perfil alélico ST8 hay múltiples cepas de *S.aureus* registradas en la www.mlst.net, tanto sensibles como resistentes a meticilina, lo más destacable de este perfil alélico es que se ha relacionado con cepas SARM de origen comunitario productoras de la leucocidina de Panton-Valentine.

3.3. Caracterización genotípica mediante SCCmec

El estudio de la estructura del cassette cromosómico se realizó en 91 cepas entre las que estaba representada al menos una cepa de cada clon, excepto para los tres clones más frecuentes (P, Q y BA) en los que se analizaron 22, 22 y 6 cepas respectivamente. El 53% de las cepas estudiadas tenían un SCCmec tipo IV (46% IVA y 17% IV), el 20% eran tipo I (15% I y 5% IA), el tipo II tenía una frecuencia del 10% y el SCCmec tipo III estaba presente en muy bajo porcentaje, 1%. Se hallaron cuatro cepas no tipables (4%) (Figura 3.10).

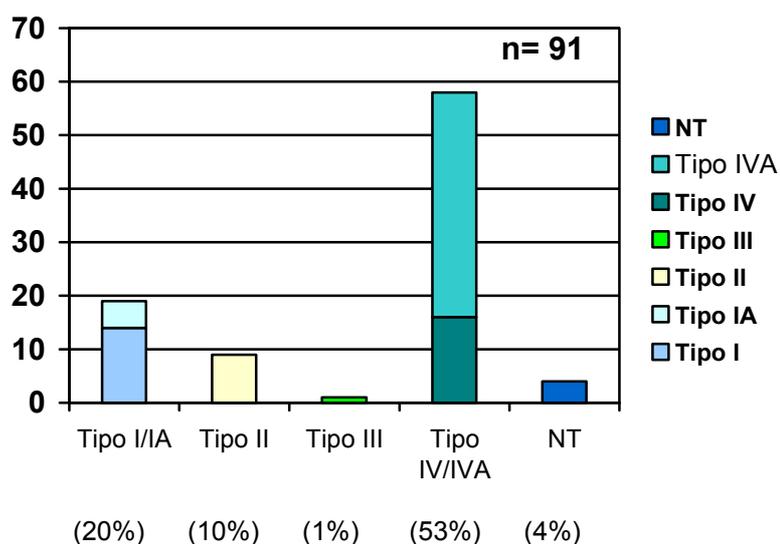


Figura 3.10- Número de cepas y porcentaje de los diferentes tipos SCCmec en 91 cepas estudiadas.

En la figura 3.11 se representan los tipos SCCmec encontrados y su relación con los patrones genotípicos.

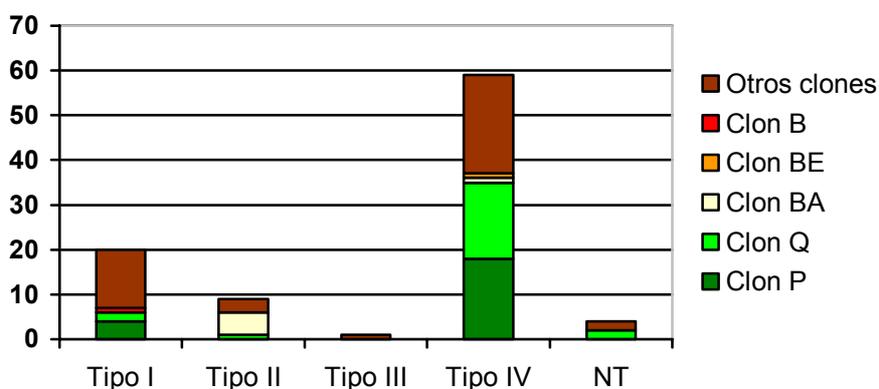


Figura 3.11- Representación de los tipos SCCmec y su asociación con los clones.

Entre las cepas del genotipo P, la mayoría (18/22, 82%) fueron portadoras de un SCCmec tipo IV, en las 4 restantes se encontró SCCmec tipo I (18%) (figura 12), Los resultados entre las cepas del clon Q son idénticos: 17/22 (77%) fueron portadoras de un SCCmec tipo IV, en las restantes 2 cepas portaban SCCmec tipo I, 1 cepa SCCmec tipo II y 2 fueron no tipables.

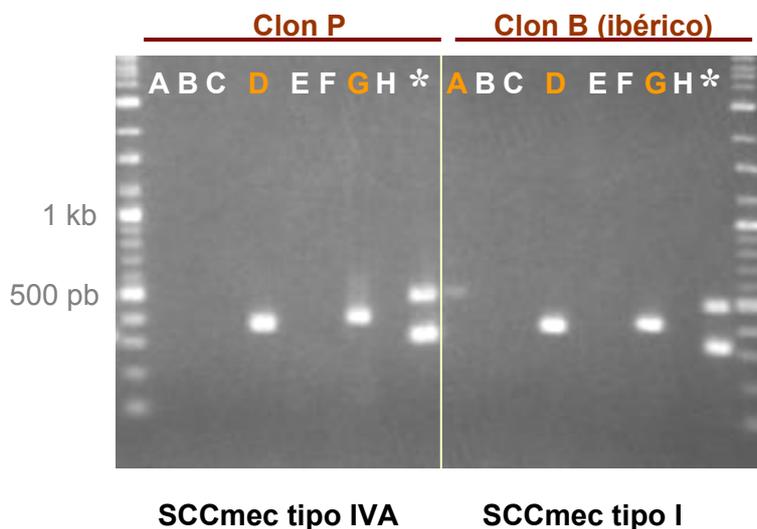


Figura 3.12.- Análisis de la estructura del SCCmec en dos aislamientos representantes del clon P y B. Las letras mayúsculas representan cada uno de los genes amplificados por PCR, en blanco los genes negativos, en naranja los genes positivos. Al genotipo P le corresponde un SCCmec tipo IVA y al genotipo B un SCCmec tipo I.

El asterisco muestra la amplificación del gen *mecA* (310 pb) y su control interno, 16SrRNA, (479 pb). (pb, pares de bases; kb, kilobases).

De las 6 cepas con genotipo BA (EMRSA-16), 5 fueron SCCmec tipo II y 1 cepa tipo IV (figura 3.13).

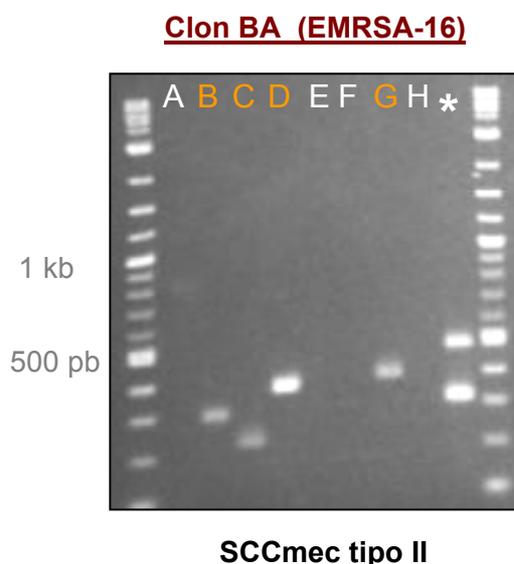


Figura 3.13.- Análisis de la estructura del SCCmec en un aislamiento representante del clon BA (EMRSA-16), al que le corresponde un SCCmec tipo II. Las letras mayúsculas representan cada uno de los genes amplificados por PCR, en blanco los genes negativos, en naranja los genes positivos. El asterisco muestra la amplificación del gen *mecA* (310 pb) y su control interno, 16SrRNA, (479 pb). (pb, pares de bases; kb, kilobases)

Se analizó también la estructura del SCCmec en 41 cepas que pertenecían a 36 genotipos por ECP poco frecuentes ó únicos. En este grupo, también el SCCmec tipo IV fue el más frecuente (23/41, 56%), seguido por el SCCmec tipo I (12/41, 29%). De las 6 cepas restantes (15%) 3 fueron SCCmec tipo II, 1 SCCmec tipo III y 2 cepas no pudieron tiparse. Dos cepas estudiadas en este grupo, representantes de clones pandémicos, fueron una genotipo B, (clon ibérico) con SCCmec tipo I (figura 3.14) y otra genotipo BE (EMRSA-15) con SCCmec tipo IV, tal y como se describe en la literatura.

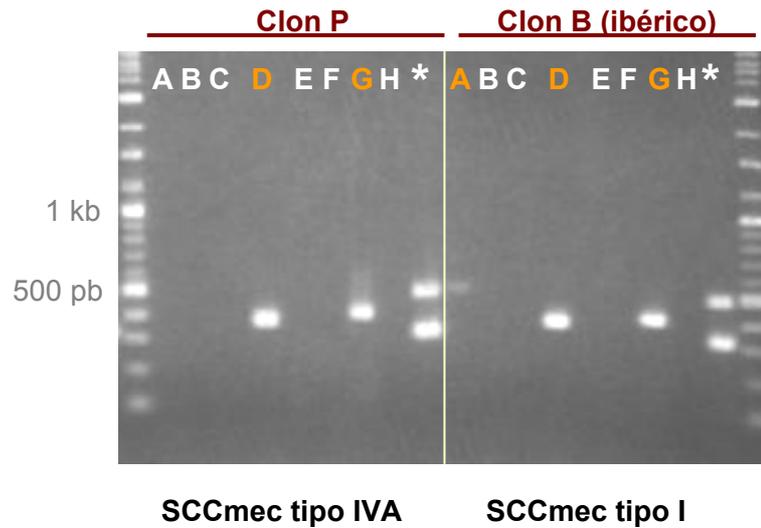


Figura 3.14.- Análisis de la estructura del SCCmec en dos aislamientos representantes del clon P y B. Las letras mayúsculas representan cada uno de los genes amplificados por PCR, en blanco los genes negativos, en naranja los genes positivos. Al genotipo P le corresponde un SCCmec tipo IVA y al genotipo B un SCCmec tipo I. El asterisco muestra la amplificación del gen *mecA* (310 pb) y su control interno, 16SrRNA, (479 pb). (pb, pares de bases; kb, kilobases).

4. Mecanismos de resistencia a macrólidos, lincosaminas y estreptogramina B. Distribución de los genes de resistencia correspondientes.

Del total de 424 cepas incluídas en el estudio, 325 (77%) fueron resistentes a eritromicina.

Entre las cepas resistentes a eritromicina, 194 mostraron también resistencia a lincosamidas y estreptogramina B, fenotipo MLS_B (60%), y 131 mostraron resistencia a macrólidos y estreptogramina B, fenotipo MS_B (40%).

En todas las cepas se estudió por PCR la presencia de los genes implicados en esta resistencia: genes *erm* (*ermA*, *ermB* y *ermC*) responsables de la síntesis de metilasas que confieren el fenotipo MLS_B y gen *msrA*, responsable de un sistema de expulsión activa de eritromicina y estreptogramina B, que no afecta a clindamicina, fenotipo MS_B.

Entre las 194 cepas con fenotipo MLS_B se detectó el gen *ermC* en 95 aislamientos (49%) y el gen *ermA* en 92 (47%), en 7 cepas se presentaban a la vez los genes *ermC* y *ermA*. El gen *ermB* no se detectó en ningún aislamiento. En 31 cepas con fenotipo MLS_B se amplificó además el gen *msrA*, éste coexistía con el gen *ermC* en 22 aislamientos y con el *ermA* en 9.

En el 90% de las cepas con fenotipo MS_B (118/131), se amplificó el gen *msrA*.

La distribución de los genes de resistencia se muestra en las tablas 4.1 y 4.2.

Tabla 4.1- Presencia del gen *msrA* entre las cepas SARM resistentes a eritromicina.

	MS _B	MLS _B	Nº Total Cepas
<i>msrA</i> (+)	118	31(*)	149
<i>msrA</i> (-)	13	163	176
Nº Total Cepas	131	194	325

(*) 9 aislamientos *msrA+ermA* y 22 *msrA+ermC*

Tabla 4.2- Presencia de los genes *ermA*, *ermB* y *ermC* entre las cepas SARM con fenotipo MLS_B

	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>ermA+ermC</i>	Nº Total Cepas SARM- MLS_B
SARM-MLS_B	92	0	95	7	194

La distribución de los fenotipos de resistencia a macrólidos entre los 15 hospitales con ≥ 10 cepas se muestran en la tabla 4.3.

Tabla 4.3- Distribución de las cepas eritromicina resistentes entre los hospitales con ≥ 10 cepas (n=15)

Hospitales	FENOTIPO		Nº Total Cepas enviadas
	MS_B	MLS_B	
HRYC	10 (67%)	2	15
HGM	4	20 (77%)	26
HCPH	6	6	13
HUMS	1	7 (70%)	10
HVS	2	12 (80%)	15
HVH	5	2	14
HC	2	3	14
HM	3	8 (67%)	12
HI	7 (64%)	2	11
HUB	6	4	15
CHUS	1	10 (83%)	12
HXL	3	7 (63%)	11
HSP	1	5	15
HSD	-	8 (67%)	12
H. Clínico	5	4	10

En la mayoría de los hospitales predominaba el fenotipo MLS_B excepto en el Hospital Ramón y Cajal y el Hospital Insular de Gran Canaria donde fue más frecuente el fenotipo MS_B .

En lo referente a la expresión de resistencia a macrólidos y su asociación con ciertos perfiles de resistencia antibiótica:

- El fenotipo MS_B se encontró en 11 patrones de resistencia: PR18, PR21, PR26, PR33, PR35, PR38, PR49, PR57, PR60, PR63 y PR65. Siendo los más frecuentes el PR33 (56%), PR 35 (14%), PR26 (11%), y PR38 (9%).

- El fenotipo MLS_B se encontró distribuido entre 15 PRs: PR1, PR2, PR3, PR5, PR10, PR13, PR20, PR23, PR25, PR28, PR48, PR58, PR59, PR64 y PR67. Presentando mayor frecuencia el PR2 (46%), PR20 (32%) y PR10 (7%). La distribución de los genes *erm* en los distintos PR se muestra en la tabla 4.4.

El gen *ermA*, forma parte de un transposón de localización cromosómica (Tn554) estable, el gen *ermC* suele localizarse en un plásmido, con mayor riesgo de delección o adquisición. La presencia mayoritaria de genes *ermC* en cepas con PR2 (Eri-Clin-Tob-Cip), explicaría que un mismo clon muestre indistintamente PR2 (Eri-Clin-Tob-Cip) o PR4 (Tob-Cip), variante sensible a eritromicina del PR2. Este es el caso de los clones P ó Q cuyos antibiogramas más frecuentes son el PR2 y el PR4 (figura 4.1). Lo mismo sería aplicable a los clones que muestran indistintamente PR10 (Eri-Clin-Cip) o PR30 (Cip), su variante sensible a eritromicina, como es el caso de las cepas del clon BE (EMRSA-15). No ocurre el mismo fenómeno, sin embargo, entre las cepas con PR 20 (Eri-Clin-Gen-Tob-Cip), portadoras del gen *ermA*.

Dentro del fenotipo MLS_B, las cepas que comparten los genes *msrA* y *erm* pertenecen a los patrones de resistencia PR1, PR2 (48%), PR10, PR13 (22%), PR20 y PR23.

Tabla 4.4.- Distribución de los genes *erm* en los distintos patrones de resistencia antibiótica (PR).

PR	Genes <i>erm</i>		
	<i>ermA</i>	<i>ermC</i>	<i>ermA+C</i>
PR1			
Er Clin Tet Gen Tob Cip Rif	1		
PR2 (%)			
Er Clin Tob Cip	28 (31)	58 (64)	4 (4)
PR3			
Er Clin Tob		1	
PR5			
Er Clin Tet Gen Tob Cip	2		
PR10 (%)			
Er Clin Cip	1 (8)	12 (92)	
PR13			
Er Clin Clor Tob Cip	2	9	
PR20 (%)			
Er Clin Gen Tob Cip	50 (81)	10 (16)	2 (3)
PR23			
Er Clin Clor Gen Tob Cip	3	2	
PR25			
Er Clin Clor Cip		1	
PR28			
Er Clin Gen Tob SxT Cip Rif		1	
PR48			
Er Clin Gen Tob Cip Rif			1
PR58			
Er Clin SxT Tob Cip	2	1	
PR59			
Er Clin SxT Clor Tet Gen Tob Cip Rif	1		
PR64			
Er Clin SxT Clor Tob Cip	1		
PR67			
Er Clin SxT Clor Gen Tob Cip	1		
Total	92	95	7

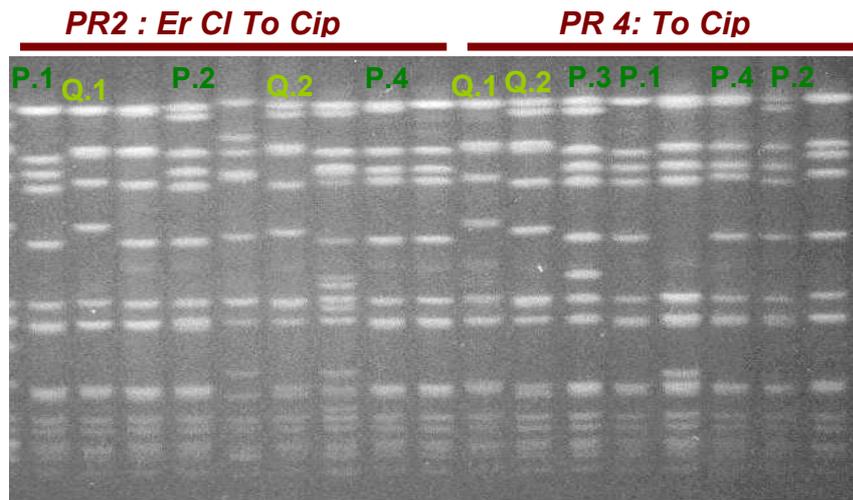


Figura 4.1.- Cepas representativas de los genotipos P (en verde oscuro.) o Q (en verde claro.) que muestran indistintamente un perfil de resistencia PR2 (portadoras del gen *ermC*) ó PR4 (*ermC*, negativo).

4.1. Distribución clonal de los genes de resistencia a macrólidos

El estudio genotípico por ECP se llevó a cabo en las 325 cepas resistentes a eritromicina. Se encontraron 36 genotipos diferentes de los cuales el 84% de las cepas se englobaban en los tres clones dominantes, P, Q y BA (Tabla 4.5).

Tabla 4.5- Genotipos mediante ECP entre las cepas eritromicina resistentes.

	FENOTIPO		Nº Total Cepas
	MS _B	MLS _B	
P (%)	22 (24%)	68 (76%)	90
Q (%)	95 (64%)	53 (36%)	148
CLONES (>3 cepas)			
BA (%)	2 (6%)	33 (94%)	35
BC	3	4	7
BE	-	4	4
BH	1	5	6
CLONES (<3 cepas)	8	27	35
Nº Total Cepas	131	194	325

En los aislamientos de genotipo P el fenotipo de expresión de resistencia a meticilina es predominantemente MLS_B (en un 76%), a diferencia del genotipo Q, en el que el 64% de las cepas expresan el fenotipo MS_B. Entre las cepas del clon BA (EMRSA-16) el fenotipo dominante es el MLS_B (94%).

En las tablas 4.6 y 4.7 se muestra la distribución de los determinantes genéticos de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B en relación con los clones dominantes.

Tabla 4.6- Distribución del gen *msrA* entre los clones dominantes resistentes a eritromicina.

	MS_B				MLS_B				N° Total Cepas
	Clon	Clon	Clon	Otros	Clon	Clon	Clon	Otros	
	P	Q	BA		P	Q	BA		
<i>msrA</i> (+)	20	92	-	6	4(*)	19(**)	2	6	149
<i>msrA</i> (-)	2	3	2	6	64	34	31	34	176
N° Total Cepas	22	95	2	12	68	53	33	40	325

(*) 3 aislamientos *msrA+ermC* y 1 *msrA+ermA*

(**) 17 aislamientos *msrA+ermC* y 2 *msrA+ermA*

Tabla 4.7- Distribución de los genes *erm* entre los clones dominantes eritromicina resistentes.

	MLS_B						N° Total Cepas
	Clon	Clon	Clon	Clon BA	Clon	Otros	
	P	Q	B		BE		
<i>ermA</i>	19	17	1	28	-	27	92
<i>ermC</i>	48	36	-	-	4	7	95
<i>ermA/C</i>	1	-	-	5	-	1	7
N° Total Cepas	68	53	1	33	4	35	194

Como se puede apreciar en las tablas anteriores, el fenotipo MLS_B es más frecuente que el fenotipo MS_B, clonalmente se relaciona con el clon P y está codificado en mayor medida por el gen *ermC*. Por el contrario, el fenotipo MS_B es más frecuente entre el clon Q y está codificado por el gen *msrA*. El único aislamiento representante del clon B (clon ibérico), fenotipo MLS_B, presenta el gen *ermA*. El clon BA (EMRSA-16), en su mayoría fenotipo MLS_B, es portador del gen *ermA*, y el clon BE (EMRSA-15), fenotipo MLS_B, es portador del gen *ermC*.

5. Estudio de la producción de Leucocidina de Panton Valentine.

El estudio de la producción de Leucocidina de Panton Valentine (LPV) se llevó a cabo en dos grupos de cepas:

- Cepas de probable adquisición comunitaria. Para identificar estos casos, se llevó a cabo una comprobación individual de los casos informados como comunitarios a través de la encuesta epidemiológica. En 19 pacientes se tuvo la sospecha de adquisición comunitaria y se estudió la producción de LPV. Sin embargo la adquisición comunitaria sólo pudo comprobarse en 10 pacientes, 2%, en el resto fue catalogada como adquisición relacionada con la atención sanitaria.
- Cepas que por su origen (muestras cutáneas y subcutáneas, frotis de abscesos y heridas), patrón de ECP (genotipos esporádicos o con aislamientos únicos) o sensibilidad antibiótica (cepas sólo resistentes a beta-lactámicos y a pocos grupos antibióticos más) fuesen candidatas a producir LPV ó a haber sido adquiridas en el ámbito extrahospitalario. A este grupo se sumaron 85 cepas más.

En total se estudió la presencia del gen productor de LPV en 104 cepas por PCR, de las cuales se obtuvo una amplificación positiva en tres de ellas. Las tres cepas con LPV positiva, fueron aisladas en Barcelona (dos en el Hospital de S. Pau y la otra en el Hospital de Bellvitge), pertenecían al mismo genotipo por ECP (genotipo BG) (figura 5.1), todas tenían una estructura del SCCmec tipo IV y les correspondía un MLST tipo 8. En cuanto a su sensibilidad antibiótica, una era resistente sólo a antibióticos beta-lactámicos (PR12), otra era resistente además a tobramicina y ciprofloxacina (PR4) y la tercera era resistente a beta-lactámicos y tetraciclina. Dos de estas cepas habían sido comunicadas como de adquisición comunitaria.

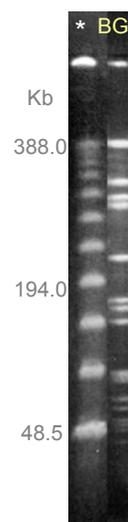


Figura 5.1.- Perfil de ECP de cepa con LPV positiva. El asterisco muestra un control de peso molecular (*Lambda ladder*, New England Biolabs).

***D*ISCUSIÓN**

En esta tesis se ha pretendido hacer un estudio general de la situación actual del *S. aureus* resistente a meticilina en España desde el punto de vista microbiológico, incluyendo el análisis de la sensibilidad antibiótica y de la epidemiología molecular de las cepas SARM circulantes en España. Para ello se ha contado con una amplia representación de hospitales de distintas categorías, distribuidos por prácticamente todas las Comunidades Autónomas españolas. El número final de cepas recogido durante el mes de Junio de 2003 fue de 424, obtenidas de 64 hospitales

La rapidez y facilidad con que se producen cambios evolutivos en los diferentes microorganismos hacen conveniente la vigilancia epidemiológica utilizando sistemas microbiológicos de tipificación, fenotípicos y genotípicos, que nos permitan realizar estudios epidemiológicos más completos para entender la evolución de los microorganismos patógenos y así poder establecer medidas de control.

Las técnicas de epidemiología molecular permiten conocer características genéticas de los microorganismos, que no quedan reflejadas por otras técnicas de laboratorio fenotípicas en las que, en ocasiones, ocurren problemas de reproducibilidad y poder de discriminación. En este trabajo se ha utilizado la combinación de tres métodos moleculares (Electroforesis en campo pulsátil, *Multilocus sequence typing* y análisis de la estructura del *Staphylococcal cassette chromosome mec*), lo que nos ha permitido obtener una buena caracterización clonal de los microorganismos y contribuir al establecimiento de la relación genética entre las cepas de SARM circulantes en los hospitales españoles.

1. Porcentaje de resistencia a meticilina en *S. aureus* aislados en diferentes hospitales españoles durante el mes de junio de 2003.

S. aureus resistente a meticilina (SARM) es uno de los patógenos causantes de infección nosocomial que más rápidamente se ha extendido entre los hospitales. Su presencia en áreas relacionadas con la asistencia sanitaria extrahospitalaria, como pueden ser residencias geriátricas y centros de crónicos, es cada vez más importante y su expansión a la comunidad ha sido uno de los hechos epidemiológicos más relevantes últimamente. (Chambers, 2001).

Las primeras cepas de *S. aureus* resistente a meticilina se describieron a principios de los años 60, pero no es hasta los años 80 cuando empieza a expandirse y a considerarse un importante problema. En España la tendencia de SARM también ha ido en aumento. Los datos recogidos en el Estudio de Prevalencia de Infecciones Nosocomiales en los hospitales españoles -EPINE- durante el período de 1990 a 1999 (Cantón, 2001) reflejan que la prevalencia de SARM durante la década de los 90 tuvo un crecimiento constante, pasando de cifras del 5% en 1990 a cifras del 18-19% en 1994-95 hasta alcanzar en 1999 el 40%. Este aumento sin embargo, no ha ido acompañado de un incremento de las infecciones por *S. aureus*, sino que ha sido a expensas de una disminución en la prevalencia de las cepas sensibles a meticilina, es decir, hay una mayor probabilidad de que las infecciones que se producen estén originadas por cepas resistentes a meticilina.

Durante el período de este estudio (junio de 2003) la resistencia media a meticilina en *S. aureus* entre los hospitales participantes fue del 20%. A partir de la información suministrada por la encuesta epidemiológica, durante el año previo, 2002, este porcentaje fue muy similar, del 21% (Rodríguez-Baño, 2006). Este porcentaje es muy similar al encontrado en 39 hospitales españoles en el año 2003 según el European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) (EARSS, 2003), que fue del 24%, siendo algo más elevado en el 2004, 26% (EARSS, 2004). Sin embargo en el estudio realizado por el Grupo Español para el Estudio de Estafilococos en el que participaron 143 hospitales

en el año 2002, la frecuencia media de SARM fue más elevada, del 31% (Cuevas, 2004).

La tasa de SARM en España según los datos reflejados de nuestro estudio, es inferior a la encontrada en otros países próximos como Portugal (45%), Francia (29%), Italia (38%) y el Reino Unido (43%) (EARSS, 2003).

A diferencia de lo que ocurre en nuestro país, en EEUU la resistencia a oxacilina en *S. aureus* ha aumentado entre 1992 (35,9%) y 2003 (64,4%) sobre todo en las UCIs hospitalarias (Klevens, 2006).

2. Estudio de la sensibilidad y los patrones de resistencia antibiótica de las cepas SARM obtenidas para el estudio.

S. aureus ha sido capaz de expresar y desarrollar múltiples mecanismos de resistencia antibiótica, intrínsecos o adquiridos, durante su evolución. Así ha ido adquiriendo resistencia a gran parte de los antimicrobianos adecuados para el tratamiento de las infecciones estafilocócicas, lo que ha hecho necesario la búsqueda constante de nuevos antimicrobianos.

A lo largo de estos años se han descrito en la literatura trabajos sobre cepas de SARM con resistencia múltiple, ello puede deberse a una sucesiva adquisición de plásmidos y transposones con determinantes de resistencia, ó bien, a la diseminación de algunas líneas clonales resistentes (Witte, 1999; Oliveira, 2002).

En nuestro estudio la resistencia a meticilina en *S. aureus*, se ve acompañada de una elevada resistencia a otros antimicrobianos como eritromicina (77%), clindamicina (46%), tobramicina (86%) y ciprofloxacino (99%). La resistencia a gentamicina es de un 25%. Por otro lado, la resistencia a rifampicina, cotrimoxazol y cloranfenicol es excepcional ó muy baja (2%,2% y 12% respectivamente). Todos los aislamientos de *S. aureus* fueron sensibles a los glucopéptidos y a nuevos antimicrobianos como linezolid y Quinupristina/Dalfopristina. Estos datos son similares a los descritos por el Grupo Español para el Estudio de Estafilococos en su estudio sobre cepas aisladas el año 2002 (Cuevas, 2004).

En cuanto a la resistencia a mupirocina, es destacable una tasa de resistencia del 20%, posiblemente debido al uso excesivo de este antibiótico como tratamiento de primera elección en la descontaminación de los portadores de SARM. En cambio, el porcentaje de resistencia al ácido fusídico, empleado como alternativa a la mupirocina en algunas ocasiones, fue muy bajo (2%).

No se ha encontrado en este estudio resistencia a vancomicina, como la descrita recientemente en Estados Unidos (CDC, 2002; CDC, 2004). Por otro lado, las cepas heterorresistentes ó con sensibilidad disminuida a glucopéptidos, descritas primeramente en Japón y posteriormente en Estados Unidos y en Europa (Hiramatsu, 1997; Smith, 1999; Ariza, 1999), se han detectado en muy bajo porcentaje, ya que sólo el 1,4% de las cepas presentaban una CMI a vancomicina de 3-4 µg/ml y a teicoplanina de 2-16 µg/ml. Sin embargo este hecho tiene relevancia clínica, ya que recientemente se han descrito casos de fallo terapéutico con vancomicina en pacientes que presentaban infección por SARM con vancomicina intermedia (Charles, 2004; Howden, 2004). De ahí la importancia de utilizar métodos apropiados en los laboratorios de microbiología (CDC, 2004; EARSS, 2005) para la detección de posibles cepas hVISA, VISA y/o VRSA.

El porcentaje de resistencia a eritromicina observado fue del 77%. El porcentaje de resistencia a clindamicina (considerando conjuntamente la resistencia constitutiva y la inducible) fue del 46%. Por tanto, el fenotipo de expresión MLS_B se encontró en el 46% de las cepas y el fenotipo MS_B en el 31%, este último es un porcentaje elevado comparado con otras series en las que se analizan los mecanismos de resistencia a macrólidos y lincosamidas en *S. aureus* en general o en SARM en particular (Denis, 2002). En este último grupo, y haciendo referencia a datos españoles obtenidos durante 2002, la proporción de fenotipos MS_B entre cepas SARM resistentes a eritromicina oscila entre el 1% (Sanchez-Roth, 2004) y el 17% (Cuevas, 2004), proporciones que todavía podrían ser inferiores ya que, al utilizar sistemas de sensibilidad automatizados, no contabilizan la resistencia inducible a clindamicina.

En el presente estudio, el 90 % de las cepas SARM con fenotipo MS_B contenía el gen *msrA*, responsable de un sistema activo de transporte de eritromicina y estreptogramina B. En el 10% restante, la resistencia a eritromicina podía ser debida a otros genes o a otro mecanismo de resistencia. Entre las cepas con fenotipo MLS_B, en todas se encontraron genes *erm*, (47% *ermA*, 49% *ermC* y 4% ambos *ermA+ermC*). En el 16% de las cepas MLS_B, se encontró además el gen *msrA*, esto sugeriría cierta facilidad de movimiento de estos genes, a los que se les atribuye un amplio rango de microorganismos portadores, tanto entre microorganismos Gram-positivos como entre Gram-negativos (Ojo, 2006)

Una forma complementaria de analizar la sensibilidad antibiótica de las cepas de SARM ha sido la asignación a cada cepa de un perfil de resistencia antibiótica, PR, constituido por los antibióticos no beta-lactámicos a los que cada aislamiento expresaba resistencia. Esta es una forma de estudiar la asociación de resistencias antibióticas y su prevalencia en los distintos hospitales. En el análisis de los patrones de resistencia antibiótica se han encontrado 36 PRs distintos, pero a pesar de esta diversidad, el 75% (319/424) de las cepas SARM se englobaban en los seis PRs más frecuentes:

- PR2, resistencia a Eri, Clin, Tob, Cip
- PR33, resistencia a Eri, Tob, Cip
- PR20, resistencia a Eri, Clin, Gen, Tob, Cip
- PR4, resistencia a Tob, Cip
- PR30, resistencia a Cip
- PR35, resistencia a Eri, Gen Tob, Cip

Estos perfiles tienen en común, en su mayoría, la resistencia a eritromicina, tobramicina y ciprofloxacino. Las variaciones en su composición recaen en pocos antibióticos, principalmente en clindamicina y, secundariamente, en gentamicina. Esto explicaría que, finalmente los genotipos encontrados sean también limitados: dos clones - P y Q - son los genotipos que se encuentran en el 76% (243/319) de las cepas que pertenecen a alguno de los seis PRs mencionados, como se discute más adelante en este capítulo.

La multirresistencia antibiótica, a cuatro ó más grupos de antibióticos, se llegó a detectar en 16 PRs distintos, sin embargo el número de cepas englobadas en este grupo representan sólo el 8% del total de aislamientos estudiados. Aunque entre estas cepas multirresistentes también se encontraron los genotipos P y Q, el 34% de ellas pertenecían a otros clones que, aparentemente, no han sido capaces de diseminarse con la misma efectividad con que lo han hecho las cepas de genotipo P ó Q. Otra observación destacable es que el patrón de resistencia PR1 (resistente a eri, clin, tet, gen, tob, cip rif) correspondiente al clon Ibérico, prevalente en las décadas anteriores, prácticamente había desaparecido, encontrándose sólo una cepa en este estudio.

De este estudio se podría deducir que, en general, se observa una disminución de las resistencias asociadas en las cepas de SARM, las cuales han sido sustituidas por cepas sensibles a un mayor número de grupos antibióticos.

Se vienen realizando diferentes estudios europeos de vigilancia epidemiológica que demuestran una relación directa entre un mayor uso de antibióticos y el aumento de resistencias, así como variaciones de resistencias entre diferentes países y entre distintas regiones y/u hospitales dentro de un mismo país. Estas diferencias pueden deberse a la diferente presión de selección de resistencias o a la diseminación de clones resistentes en algunas regiones y no en otras (Bronzwaer, 2000, Tiemersma, 2004, Goossens, 2005). En nuestro estudio los patrones de resistencia antibiótica están distribuidos por todas las zonas geográficas sin un claro predominio en ninguna de ellas, aunque los 4 PRs más frecuentes (PR2, PR4, PR20 y PR33) siguen siendo los más predominantes en todas las regiones.

La variabilidad en los patrones de resistencia y la disminución de las cepas multirresistentes podría explicarse por algunas de las razones descritas por diferentes autores entre las que se encuentran:

- Política antibiótica aplicada en cada hospital: los cambios que se realizan en el uso de los antibióticos modifican la presión selectiva de éstos. Lemaître *et al*, observaron que la disminución en el uso de los antibióticos,

sobre todo aminoglucósidos, ciclinas y macrólidos jugaban un papel importante en la aparición de cepas SARM sensibles a gentamicina, disminuyendo las cepas resistentes a este antibiótico (Lemaître, 1998). Estudios multicéntricos más recientes también señalan la importancia de limitar la presión selectiva antibiótica (Diekema, 2001). En España, Sopena *et al.* describen la aparición de cepas SARM sensibles a gentamicina en un hospital donde era endémico el clon de SARM resistente a gentamicina y atribuyen como una posible causa la disminución en el uso de aminoglucósidos (Sopena, 2001).

- Mayor capacidad adaptativa (*fitness*) de las cepas SARM sensibles a más antibióticos: Los estudios *in vitro* realizados por Laurent *et al.*, demostraron que las cepas SARM sensibles a gentamicina tenían un período de generación más rápido que las cepas resistentes (Laurent, 2001).

- Evolución genética vertical: algunos autores sugieren que las cepas de SARM habrían sufrido un proceso evolutivo clonal mediante recombinaciones por las cuales las cepas más sensibles procederían de cepas ancestrales multirresistentes (Oliveira, 2002).

- Transferencia genética horizontal: la aparición de nuevos clones de SARM podría deberse a la transferencia horizontal del elemento genético *mec* a líneas de *S. aureus* sensibles a meticilina (Enright, 2002), serían transferencias independientes del gen *mecA* a contextos genéticos más sensibles (Watson, 2003).

3. Caracterización genotípica de las cepas SARM.

En este estudio la tipificación molecular de las cepas recibidas se realizó mediante tres técnicas que fueron: electroforesis en campo pulsátil, MLST y SCCmec.

3.1. Electroforesis en campo pulsátil -ECP-

Esta técnica permite obtener un patrón simplificado de los fragmentos de restricción generados, tras la digestión del DNA cromosómico con enzimas de baja frecuencia de corte. Estas enzimas generan un número limitado e interpretable de fragmentos de DNA cuyo tamaño oscila entre 10 y 800 Kb

(Maslow, 1993). En general la ECP tiene una elevada capacidad de discriminación, ya que es muy sensible a los cambios genéticos menores existentes en una colección de cepas en un período de tiempo corto. Sin embargo, su interpretación puede generar dificultades al analizar colecciones de microorganismos endémicos, cepas que llevan muchos años circulando por una determinada área o brotes muy extensos que afectan a muchos pacientes.

En el presente estudio, los patrones de bandas obtenidos mediante ECP indican que hay una diversidad genética (40 patrones) entre las cepas SARM distribuidas por el territorio español pero a pesar de esta diversidad la mayoría de las cepas (73%) se agrupan en dos clones dominantes, el clon P y el clon Q. Estos datos se asemejan a los descritos en otros estudios en los que señalan que las cepas SARM hospitalarias se identifican con pocos clones. Así, por ejemplo, en un trabajo realizado en 164 hospitales procedentes del Sur y Este de Europa, Latino América y Estados Unidos, con más de 3000 aislamientos de SARM entre 1994 y 2000, el 68% de los aislados pertenecía a uno de los cinco clones pandémicos (Oliveira, 2002). En otro estudio realizado en 12 hospitales de siete estados de Estados Unidos con 217 aislamientos de SARM durante 1996 a 1999, el 79% se correspondía con dos únicos clones (Da Silva Coimbra, 2003).

Los clones P y Q, a pesar de haber sido considerados distintos, mostraban un coeficiente de similitud de Dice del 80% lo que indica que genéticamente están más próximos entre sí que, en comparación, con otros genotipos con los que este índice era inferior al 66%. Mediante la observación y comparación de los patrones de bandas de los distintos subtipos hallados tanto en el clon P como en el clon Q, se observó que ambos clones presentaban diferencias en tres o más fragmentos pero, a la vez, el número de diferencias no era superior a seis fragmentos. Ello permitiría, según algunos criterios de interpretación de ECP (Struelens, 1992; Tenover, 1995; Denis, 2002; Murchan, 2003), calificar estas cepas como de “probablemente relacionadas”. Éste término indicaría que los genotipos P y Q, a pesar de su distancia genética real, podrían derivar de un ancestro genético común; sus diferencias podrían explicarse por inserciones o deleciones simples, o acompañadas de ganancia o pérdida de algún lugar de restricción. Estas variaciones se observan en aislamientos obtenidos en periodos de tiempo largos, superiores a 6 meses, o

en estudios que incluyen un gran número de pacientes de diversos orígenes (Tenover, 1995). En estos casos, puede ser de gran utilidad aplicar otros marcadores genéticos que ayuden a resolver la tipificación en un sentido ó en otro. En el presente estudio, el análisis de los perfiles alélicos (ST) obtenido mediante MLST, sugería que los genotipos P y Q podrían pertenecer a un complejo clonal cuyos integrantes, más próximos entre sí que en relación a otros genotipos, derivasen de un clon anterior identificado entre 1992 y 1997 como Clon Pediátrico (Sa-Leao, 1999). El resto de los aislamientos con genotipos distintos de P o Q, supusieron el 27% del total de cepas SARM. Dentro de éste grupo es necesario señalar el genotipo BA, es el tercero en frecuencia (8%) y se corresponde con el clon internacional EMRSA-16. En menor frecuencia se encuentra el clon BE (1,6%) que presenta un patrón de bandas similar al clon epidémico internacional EMRSA-15. Estos clones fueron descritos inicialmente en hospitales del Reino Unido, pero recientemente se han identificado en otros países europeos como Bélgica, Finlandia, Suecia, Dinamarca y España (Cox, 1995; Enright, 2002; Murchan, 2003; Pérez-Roth, 2003). El genotipo identificado como B en el presente estudio muestra un patrón de bandas similar al denominado Clon Ibérico y fue identificado solamente en un aislamiento, procedente del Hospital Nacional de Parapléjicos de Toledo.

Hay una relación entre los porcentajes de resistencia antibiótica y la frecuencia de los clones. Por ejemplo, la baja resistencia a tetraciclina y a rifampicina encontrada en este estudio, se corresponde con la ausencia del Clon Ibérico, resistente a múltiples antibióticos entre los que se encuentran los dos grupos antibióticos citados. La amplia diseminación del Clon Ibérico durante los años 90, justificaba los elevados índices de resistencia antibiótica encontrados en otras series publicadas previamente (Díaz, 1994; Cercenado, 1997). Asimismo, la disminución en el porcentaje de resistencia a gentamicina, se relaciona con la presencia de clones como EMRSA-16 y EMRSA-15 y con una menor prevalencia de los clones resistentes a este antibiótico.

En relación a la correspondencia entre patrones de resistencia y genotipo por ECP, es notable la variabilidad fenotípica que se asocia a los genotipos dominantes P y Q. A pesar de ello, el genotipo P se encontró asociado con mayor frecuencia a PRs con fenotipo MLS_B, portadores del gen

erm y el genotipo Q a PRs con fenotipo MS_B, portadores del gen *msrA*. En cuanto a las diferencias geográficas por clonalidad hay que señalar que los clones P y Q se encuentran distribuidos por los hospitales del territorio español sin un claro predominio por ninguna región geográfica. Sin embargo no ocurre lo mismo con el clon BA. Este clon predomina sobre todo en la zona norte de España, concretamente en la Comunidad Gallega estando presente en 7 hospitales con una frecuencia del 63% y en menor frecuencia (58%) en 2 hospitales de Canarias, 1 hospital de Madrid, 1 hospital de Sevilla y 2 hospitales de la Comunidad Valenciana. También cabe destacar el clon BE que es predominante en las islas Baleares. Los clones EMRSA-16 y EMRSA-15 ya habían sido descritos por Pérez-Roth, en el hospital Universitario Ntra. Sra. de Candelaria de Tenerife, representando el clon EMRSA-16 un 63,5% de los aislamientos de SARM de dicho hospital y el clon EMRSA-15 un 2% (Pérez-Roth, 2003). Hasta ahora ambos clones no habían sido documentados en ninguna otra zona geográfica de España.

Recientemente se ha señalado la necesidad de crear una colaboración internacional para vigilar la diseminación de estas cepas epidémicas así como la posible aparición de otras nuevas (Murchan, 2003).

3.2. Multilocus sequence typing -MLST-

Esta técnica de tipificación molecular se está utilizando con mucha frecuencia en la caracterización genética de clones de patógenos bacterianos. Aunque su poder de discriminación es equiparable al del ECP, no tiene capacidad de registrar los cambios más recientes aparecidos en una línea clonal, por el contrario analiza secuencias muy estables del genoma bacteriano que escapan a presiones locales como, por ejemplo, determinadas políticas antibióticas (Enright, 2000). Esta razón es la que hace que sea una técnica apropiada para el estudio de series de microorganismos obtenidos en un tiempo o en un espacio amplios. Además las secuencias de los genes estudiados, permiten comparar el tipo secuencial o ST con cepas control o cepas depositadas en una base de datos internacional (www.mlst.net).

Como se ha mencionado, la aplicación del MLST ha permitido completar la tipificación de los genotipos P y Q. Los perfiles alélicos, STs, que se obtuvieron en una selección de cepas pertenecientes a estos genotipos fueron:

ST5, ST146, ST228 y ST125, éstos dos últimos encontrados indistintamente en cepas del genotipo P o del genotipo Q. ST146 y ST125 son variantes alélicas (single locus variants, SLV) de ST5 ya que sólo difieren en un único alelo, YqiL y aroE respectivamente. ST228 difiere en los alelos tpi y YqiL de ST5 (double locus variant, DLV). ST125 fue el perfil alélico encontrado con mayor frecuencia entre cepas del complejo P-Q, entre las que, además, el tipo de SCCmec fue el tipo IV. Por lo tanto, podría definirse un complejo clonal caracterizado por presentar ST125, genotipo por ECP P ó Q y SCCmec tipo IV (ST125::P/Q::mecIV), que además podría haber tenido su origen en el denominado Clon Pediátrico con idéntico ST y tipo de SCCmec (ST125::mecIV) (Oliveira, 2001) y un genotipo por ECP muy parecido al complejo P-Q. Una situación similar había sido presentada en el trabajo de Pérez-Roth et al, en el que se describen los clones de SARM dominantes en un hospital de Tenerife durante un periodo de cinco años (Pérez-Roth, 2004). El clon pediátrico se describió en un hospital de pediatría en Portugal en los años 1992-1997. En un principio se caracterizó por ser sensible a la mayoría de los antibióticos, mostrando resistencia sólo a beta-lactámicos. Posteriormente, Gomes lo describe en Colombia como un clon multirresistente y procedente no sólo de infecciones en niños sino también en adultos (Sa-Leao, 1999; Oliveira, 2001; Gomes, 2001). Los clones epidémicos internacionales EMRSA-16, EMRSA-15 y clon Ibérico identificados en este estudio como clon BA, clon BE y clon B, respectivamente, presentaron un perfil alélico ST36, ST22 y ST247, similares a los ya descritos en la literatura (Oliveira, 2002). Estos clones han presentado una diseminación internacional y su aparición en España demuestra la expansión global de algunas cepas de SARM.

3.3. Staphylococcal cassette chromosome mec -SCCmec-

El análisis de los componentes del SCCmec es el método menos discriminativo utilizado como marcador molecular, sin embargo permite analizar la vecindad del gen *mecA* y los elementos presentes en este *cassette*. En combinación con el MLST permite caracterizar mejor las diferentes cepas y hace más fácil la comparación con cepas analizadas en otros estudios. En el caso de los Clones Nueva York/Japón y Pediátrico, ambos son ST5 pero se

distinguen por el tipo de SCCmec: ST5::mecII en el Clon Nueva York/Japón y ST5::mecIV en el Clon Pediátrico.

En el presente estudio el SCCmec tipo IV se ha encontrado en más de la mitad de las cepas estudiadas, siendo mayoritario entre las cepas del complejo P-Q. Estos resultados son similares a los descritos por Oteo *et al.* en un estudio realizado con >1500 SARM aislados en hospitales españoles durante el período 2000-2002, donde obtuvieron que >60% de los SARM estaban relacionados genéticamente con dos clones los cuales eran portadores de un SCCmec tipo IV (Oteo, 2004).

En lo referente a los clones epidémicos internacionales encontrados en esta serie de SARM, el tipo de SCCmec contribuyó a confirmar su similitud con dichas cepas. Así, el clon BA se correspondía con ST36::EMRSA16::mecII, el clon BE se correspondía con ST22::EMRSA15::mecIV, y el clon B, Clon Ibérico, presentaba ST247::mecI .

Se ha descrito que el tamaño del SCCmec está relacionado con su facilidad para transferirse (Ito, 2001). De acuerdo con esta hipótesis, el SCCmec más pequeño se encontraría asociado a un mayor número de STs. Así el SCCmec tipo IV (22 kb) estaba asociado con 12 STs, el SCCmec tipo I (40 kb) con 5 STs y el SCCmec tipo II (52 kb) con 2 STs. Al igual que ocurre en nuestro estudio, el tipo IV es uno de los elementos más frecuentemente observados en cepas SARM adquiridas en infecciones hospitalarias en otros países (Oliveira, 2001; Fey, 2003; De A Trindade, 2005), inicialmente se describió asociado a aislamientos de SARM de adquisición comunitaria (CDC, 1999; Okuma, 2002; De Sousa, 2003).

El SCCmec tipo V ha sido descrito en cepas comunitarias de Australia (Ito, 2004). Recientemente se han encontrado cepas en Taiwan (Chen, 2005) con ST59 y mec tipo V, que se han comportado como un clon virulento y prevalente. Se ha detectado infectando tanto pacientes hospitalizados como pacientes extrahospitalarios , con localización sobre todo en heridas. En nuestro trabajo ninguna de las cepas estudiadas presentaba un SCCmec tipo V.

4. Estudio de los genes de resistencia a macrólidos y su distribución clonal.

Los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas son antibióticos de uso frecuente en el tratamiento de las infecciones estafilocócicas, lo que ha supuesto que estas especies desarrollen mecanismos de resistencias contra dichos antibióticos. Se han descrito diferentes mecanismos entre los que cabe destacar: (i) la resistencia mediada por metilasas, cuyos principales determinantes genéticos en estafilococos son *ermA*, *ermB* y *ermC* confiriendo el fenotipo MLS_B, y (ii) la resistencia mediada por bombas de flujo, codificada principalmente por el gen *msrA* que confiere el fenotipo MS_B (Ross, 1990; Leclercq, 1991).

En este trabajo se estudiaron los determinantes de resistencia a macrólidos en un total de 325 cepas resistentes a eritromicina mediante el método de PCR (Lina, 1999)

Entre las cepas que presentaban un fenotipo MLS_B (60%), prácticamente encontramos la misma proporción de aislamientos con el gen *ermC* (49%) que con el gen *ermA* (47%). La presencia de ambos genes se detectó en un 4% de las cepas. El gen *ermB* no se detectó en ningún aislamiento.

El fenotipo de expresión MS_B se encontró en el 40% de los microorganismos resistentes a eritromicina, porcentaje más elevado que en otros trabajos en los que se también se estudian *S. aureus* (Denis 2002; Melter, 2003). Este mecanismo de resistencia está mediado por fenómenos de expulsión activa y es más frecuente en estafilococos coagulasa negativos que en *S. aureus* (Lina, 1999). El principal gen responsable de este fenotipo MS_B en estafilococos es el gen *msrA*, de localización plasmídica (Butaye, 2003). Entre las cepas con expresión MS_B, el 90% eran portadoras del gen *msrA*, en el resto la resistencia podría ser debida a otros genes o a otros mecanismos de resistencia.

En 31 cepas de las 325 resistentes a eritromicina (16%), se encontraron simultáneamente genes de la familia *erm* y el gen *msrA*. Estas cepas se manifestaban con fenotipo MLS_B, quedando enmascarado el fenotipo MS_B. En estos casos el papel que juega el gen *msrA* puede ser el de aumentar la resistencia a mayor número de antibióticos o bien, podría estar relacionado con

una mayor virulencia de las cepas, como señalan algunos autores (Reynolds, 2003). En nuestro trabajo los aislamientos que comparten ambos genes no presentaron una mayor resistencia antibiótica, siendo el PR2 (resistencia a Eri-Clin-Tob-Cip), el patrón de resistencia más frecuente en este grupo de cepas. Un estudio de 294 cepas aisladas en 1995 en 32 hospitales franceses (Lina, 1999) y otro trabajo de 100 aislamientos de SARM entre 2000-2002 en 21 hospitales de la República Checa (Melter, 2003), concluyen que el gen *ermA* es más frecuente que el gen *ermC*, siendo el gen *ermA* más prevalente en los aislamientos de *S. aureus* resistente a meticilina, mientras que el gen *ermC* es más frecuente en los *S. aureus* sensibles a meticilina. Este hecho, que no observamos en nuestro estudio, tiene que ver con los clones epidémicos dominantes en una determinada área, así el gen *ermA* que forma parte del transposón Tn554 en el cromosoma (Murphy, 1985) es un gen probablemente más estable que el gen *ermC* de localización plasmídica. (Novick, 1985)

En relación a la distribución de los genes de resistencia en los clones encontrados en el presente estudio, como ya se señaló anteriormente en esta discusión, el fenotipo MLS_B con resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B, se encuentra principalmente asociado al clon P, portador del *ermC*. Por el contrario, el fenotipo MS_B resistente a macrólidos de 14 y 15 átomos y a estreptogramina B, se detecta con más frecuencia en cepas clon Q y su determinante genético es el gen *msrA*. El clon B (clon Ibérico), de expresión MLS_B, es portador del gen *ermA*. El clon BA (EMRSA-16), con expresión MLS_B, está codificado en su mayoría por el gen *ermA*, y el clon BE (EMRSA-15), MLS_B, por el gen *ermC*.

5. Estudio de la producción de Leucocidina de Panton-Valentine.

La producción de leucocidina de Panton-Valentine (LPV), una potente toxina necrotizante, se ha asociado a las cepas SARM adquiridas en la comunidad, hasta el punto de ser considerado un marcador genético que indica el origen comunitario de la adquisición (Vandenesch, 2003). SARM se consideró un importante patógeno a nivel nosocomial hasta 1980-81 cuando en Detroit se describe el primer brote de SARM adquirido en la comunidad

(Saravolat, 1982). Posteriormente, en 1993, en Australia se detectan las primeras cepas de SARM de adquisición comunitaria (Udo, 1993). En 1999 este microorganismo comienza a causar gran interés y preocupación en la sociedad debido a la muerte de 4 niños, sin factores de riesgo, en Minnesota y Norte de Dakota, EEUU, como resultado de la infección causada por SARM de origen comunitario (CDC, 1999). Durante estos últimos años, estas cepas virulentas comienzan a detectarse en la comunidad con frecuencia creciente. Su capacidad de virulencia se debe, en parte, a la producción de LPV, sintetizada por la mayoría de cepas relacionadas con infecciones de piel y partes blandas, y, excepcionalmente, neumonía necrotizante.

En nuestro país la mayoría de los datos disponibles proceden de estudios hospitalarios, que informan tasas muy variables sobre los casos de SARM. Los últimos trabajos del Grupo de Estudio de Estafilococos reflejan un aumento de SARM de probable origen comunitario que varía desde el 5% en el año 86 al 17,8% en el 2002 (Cuevas, 2004). Sin embargo estos datos deben ser tomados con cautela, puesto que en muchas ocasiones el origen comunitario es difícil de establecer y en realidad la adquisición está relacionada con la atención sanitaria. En el presente estudio, el seguimiento individualizado de los datos epidemiológicos reveló que sólo en 10 pacientes, de los 424 incluídos (2%), la adquisición del SARM podía ser calificada de comunitaria.

La producción de LPV fue detectada solamente en 3 aislamientos SARM, dos de las cuales habían sido indicadas como de adquisición comunitaria. Estas cepas presentaron características comunes: aisladas de pacientes jóvenes, sin factores de riesgo, procedían de muestras de heridas. En general, mostraron sensibilidad a un elevado número de grupos antibióticos. No presentaron resistencia al ácido fusídico, en contra de lo que describen algunos autores (Maier, 2005). Genotípicamente, se caracterizaron por pertenecer al mismo clon: idéntico perfil alélico, MLST, ST8; idéntico patrón de ECP, BG; y un SCCmec tipo IV (ST8::BG::mecIV). Las tres cepas procedían de dos hospitales en Barcelona.

Las características genéticas de este clon productor de LPV, se diferenciaban de las observadas entre las cepas de adquisición hospitalaria. Este clon (ST8::mecIV) no se corresponde con los clones productores de LPV

más comunes en Francia o Suiza, sino con uno de los descritos en los EEUU (Vandenesch, 2003).

CONCLUSIONES

- 1.** El porcentaje de resistencia a meticilina en las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas durante el período del mes de junio de 2003 en los hospitales españoles fue del 20%. Este porcentaje es similar al obtenido en el año 2002 e inferior a los datos publicados en nuestro país en la década de 1990.
- 2.** La mayoría de las cepas de *S. aureus* resistente a meticilina presentaron resistencia a ciprofloxacino y tobramicina. Una quinta parte de las cepas fueron resistentes a mupirocina. No se detectó resistencia a los nuevos antibióticos, linezolid y quinupristina/dalfopristina.
- 3.** Aunque no se observó resistencia a gluco péptidos, un 1,4% de las cepas presentaron una disminución de la sensibilidad a vancomicina, caracterizada por un patrón de heterorresistencia.
- 4.** Entre las cepas resistentes a eritromicina, el 60% presentaron un fenotipo MLS_B, debido a la presencia de metilasas codificadas por los genes *ermA* y *ermC*, mientras que el 40% restante presentaron un fenotipo MS_B, debido a un sistema de expulsión activa codificado por el gen *msrA*.
- 5.** Mediante la utilización de tres marcadores moleculares (perfil alélico ó *Multilocus Sequence Typing*, macrorrestricción del ADN cromosómico y análisis del *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) se identificó un complejo clonal ó linaje genético dominante (*ST125::P::mecIV*, *ST146::P::mecIV*, *ST125::Q::mecIV*) al que pertenecían el 73% de las cepas.
- 6.** El ancestro genético de éste complejo clonal dominante podría estar relacionado con el clon internacional denominado *Clon Pediátrico*, cuyos perfiles alélicos difieren solamente en un gen y presentan genotipos cromosómicos parecidos e idéntica estructura de SCCmec (*ST5::mecIV*)

- 7.** Los perfiles de resistencia antibiótica asociados al complejo clonal dominante fueron variados. La mayoría de las cepas fueron resistentes a ciprofloxacina, tobramicina y eritromicina, mientras que la resistencia a clindamicina y a gentamicina fue menos frecuente.
- 8.** Se detectaron otros 38 clones a los que pertenecieron el 27% de los aislamientos estudiados. La prevalencia de los clones internacionales EMRSA-16 (*ST36::mecII*) y EMRSA-15 (*ST22::mecIV*) fue del 8% y del 2%, respectivamente. Sólo un aislamiento perteneció al Clon Ibérico (*ST247::mecI*).
- 9.** El complejo clonal dominante se detectó en todos los hospitales participantes en el estudio, mientras que el clon EMRSA-16 se aisló preferentemente en la Comunidad Gallega y en la Comunidad Canaria y el clon EMRSA-15 sólo se aisló en un hospital de Palma de Mallorca.
- 10.** La prevalencia de aislamientos de SARM de origen comunitario, productores de leucocidina de Pantón-Valentine fue baja (3%).
- 11.** Las tres cepas productoras de leucocidina de Pantón-Valentine fueron aisladas en dos hospitales en Barcelona y pertenecieron al mismo clon (*ST8::BG::mecIV*).

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham EP, Gardner AD, Chain E, et al. Further observations on penicillin. *Lancet* 1941; ii: 177-89.
- Aires de Sousa M, Sanches IR, Ferro ML, Vaz MJ, Saraiva Z, Tendeiro T, et al. 1998. Intercontinental of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J Clin Microbiol.* 36: 2590-2596.
- Aires de Sousa M, de Lencastre H, Santos Sanches I., Kikuchi K., Totsuka K. and Tomasz A. 2000. Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and in a hospital in Tokyo, Japan. *Microb. Drug Resist.* 6: 253-258.
- Aires de Sousa M, Miragaya M, Sanches IS, Avila S, Adamson I, Casagrande ST, Brandileone MC, Palacio R, Dell'Acqua L, Hortal M, Camou T, Rossi A, Velásquez-Meza ME, Echaniz-Aviles G, Solórzano-Santos F, Heitmann I, and De Lencastre H. 2001. Three-year assesment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America from 1996 to 1998. *J Clin Microbiol.* 39: 2197-2205.
- Aires de Sousa M, Bartzavali C, Spiliopoulou I, Santos Sanchez I, Crisostomo ML, and De Lencastre H. 2003. Two international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones endemic in a university hospital in Patras, Greece. *J Clin Microbiol.* 41: 2927-2031.
- Aires de Sousa, M. and de Lencastre H. 2003. Evolution of sporadic isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals and their similarities to isolates of community-acquired MRSA. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3806-3815.
- Aires de Sousa, M. and de Lencastre H. 2004. bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Inmunol Med Microbiol.* 40: 101-111.
- Alarcón T, Sanz JC, Blanco F, Domingo D, and López-Brea M. 1998. High-level mupirocin resistance among Spanish methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *E J Clin Microbiol and Infect Dis.* 17: 877-879.
- Andrews JM, Ashby JP, and Wise R. 1999. Study to assess the reliability of a disc diffusion method for determining the sensitivity of Gram-positive pathogens to dalfopristin/quinupristin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 43: 141-143.
- Arakere G, Nadig S, Swedberg G, Macaden R, Amarnath SK, Raghunath D. 2005. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from two hospitals in Bangalore, South India. *J Clin Microbiol.* 43: 3198-3202.

- Appelbaum PC. 2006. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 12 (suppl. 1): 16-23.
- Arbeit DC. 1995. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. P: 190-208. A: Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. Editor: PR Murray, EJ Baron, MA Tenover, FC Tenover and RH Tenover. ASM Press, Washington D.C. (EEUU).
- Archer GL, and Archer J. 1991. Conjugate transfer genes in staphylococcal isolates from the United States. Agents and Chemother. 35:2500-2504.
- Archer GL., and Niemeyer DM. 1994. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. Trends to Microbiology. 2:343-347.
- Archer GL, Bosilevac JM. Signaling antibiotic resistance in staphylococci. Science 2001; 291:1915-6.
- Ariza J, Pujol M, Cabo J, Peña C, Fernandez N, Linares J, Ayats J, and Gudiol F. 1999. Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. Lancet. 353: 1587-1588.
- Arthur M, Molinas C, Depardieu F, and Courvalin. 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. J Bacteriol. 175: 117-127.
- Asensio A, Cantón R, Vaqué J, Rosselló J, Arribas JL y Grupo de Trabajo EPINE. 2002. Etiología de las infecciones hospitalarias en España (EPINE, 1990-1999). Med Clin (Barc). 118:725-30.
- Aucken HM, Warner M, Ganner M, Johnson AP, Richardson JF, Cookson BD, Livermore DM. 2000. Twenty months of screening for glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 46: 639-640.
- Ayliffe GA. 1977. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 24(supl.1): 74-79.
- Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, and Hiramatsu K. 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet. 359: 1819-1827.
- Baggett HC, Hennessy TW, Leman R, Hamlin C, Bruden D, Reasonover A, Martínez P, and Butler JC. 2003. An outbreak of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections in south-western Alaska. Infect Control Hosp Epidemiol. 24: 397-402.

- Back NA, Linnemann CC, Pfaller MA, Staneck JL, and Morthland V. 1993. Recurrents epidemic caused by a single strain of erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*: the importance of molecular epidemiology. *JAMA*. 270: 1329-1333.
- Balfour JA, Figgitt DP. 2001. Telithromycin. *Drugs*. 61: 815-829.
- Bannerman TL. 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. A: Manual of Clinical Microbiology. 8^a Ed. Editor: P.R. Murray. ASM Press, Washington D.C. (EEUU)
- Barber M. 1947. Staphylococcal infection due to penicillin-resistant strains. *Br Med J*. 2:863-865.
- Bradley SF, Terpenning MS, Ramsey MA, Zarins LT, Jorgensen KA, Sottile WS, et al. 1991. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: colonization and infection in a long-term care facility. *Ann Intern Med*. 15: 417-422.
- Bradley SF. 1999. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: long-term care concerns. *Am J Med*. 106(suppl 5A): 2S-10S.
- Beck WD, Berger-Bächi B and Kayser FH. 1986. Additional DNA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of mec-specific DNA. *J Bacteriol*. 165: 373-378.
- Bell JM, and Turnidge JD. 2002. High prevalence of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Asia-Pacific and South Africa: results from SENTRY antimicrobial surveillance program, 1998-1999. *Antimicrob Agents Chemother*. 46: 879-881.
- Benner EJ, Kayser FH. 1968. Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2: 741-744.
- Berger-Bächi B, Barberis-Maino L, Strässle A, and Kayser FH. 1989. *FemA*, a host-mediated factor essential for methicillin resistant in *Staphylococcus aureus* molecular cloning and characterization. *Mol Gen Genet*. 219: 263-269.
- Berger-Bächi B. 1994. Expression of resistance to methicillin. *Trends in Microbiology*. 2:389-393.
- Berglund C, Molling P, Sjöberg L, Söderquist B. 2005. Predominant of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type IV among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Swedish county and presence of unknown SCCmec with Panton-Valentine leukocidin genes. *Clin Microbiol Infect*. 11: 447-456.
- Birren B and Lai E. 1993. Pulsed-field gel electrophoresis: a practical guide. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.

- Bouza E, Martínez-Beltrán J. 1988. Estudio multicéntrico sobre la prevalencia de estafilococos en España. *Enf Infecc Microbiol Clin*. 6: 68-79.
- Bronzwaer SL, Cars O, Büchol U, et al. 2000. A European study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis*. 3: 278-282.
- Butaye P, Cloeckaert A, Schwarz S. 2003. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Antimicrob Agents*. 22: 205-210.
- Cabeceran CB, Picazo de la Garza JJ. Glucopéptidos. En: Garcia Sánchez JE, López R, Prieto J (Eds). *Antimicrobianos en medicina*. Sociedad Española de Quimioterapia. Barcelona, España. 1999; 363-369.
- Campbell KM, vaughn AF, Russell KL, Smith B, Jimenez DL, Barrozo CHP, Minarcik JR, Crum NF, and Ryan MAK. 2004. Risk factors for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in a outbreak of disease among military trainees in San Diego, California, in 2002. *J Clin Microbiol*. 42: 4050-4053.
- Cantón R, Asensio A. Diagnósticos etiológicos. In: Vaqué Rafart J, Roselló Urgell J, editores. *Evolución de la prevalencia de las infecciones nosocomiales en los hospitales españoles. EPINE 1990-1999*. Madrid: Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene, 2001, p. 241-298.
- Cassone M, Campanile F, Pantosti A, Venditti M, and Stefani S. 2004. Identification of a variant "Rome clone" of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with decreased susceptibility to vancomycin, responsible for an outbreak in a intensive care unit. *Microb Drug Resist*. 10: 43-49.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1997. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin- United States. *MMWR* 1997. 46: 765-766.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1997. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin- United States. *MMWR* 1997. 46: 813-815.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1999. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*- Minnesota and North Dakota, 1977-1999. *JAMA*. 282: 1123-1125.
- Centers for Disease Control and Prevention -CDC-. 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin- United States, 2002. *MMWR morb Mortal Wkly Rep*. 51: 565-567.

- Centers for Disease Control and Prevention -CDC-. 2002. Public health dispatch: vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* - Pennsylvania, 2002. MMWR morb Mortal Wkly Rep. 51: 902.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2003. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among competitive sports participants-Colorado, Indiana, Pennsylvania, and Los Angeles Country, 2000-2003. MMWR morb Mortal Wkly Rep. 52: 793-795.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2003. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in correctional facilities- Georgia, California and Texas, 2001-2003. MMWR morb Mortal Wkly Rep. 52: 992-996.
- Centers for Disease Control and Prevention -CDC-. 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: New York, 2004. MMWR morb Mortal Wkly Rep. 53: 322-323.
- Cercenado E, Sánchez-Carrillo C, Alcalá L, Bouza E. 1997. Situación actual de la resistencia de *Staphylococcus* en España. Rev Clin Esp. 197 (2): 18-24.
- Clark NC, Weigel LM, Patel JB, Tenover FC. 2005. Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother. 49: 470-472.
- Coello R, Jiménez J, García M, Arroyo P, Minués D, fernández C, et al. 1994. Prospective study of infection, colonization and carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a outbreak affecting 990 patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 13: 74-81.
- Cohen PR. 2005. Cutaneous community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in participants of athletic activities. Southern Med Associat. 98: 596-602.
- Coll P., Prats G. Epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. En: Ausina V., Moreno S. (Ed). Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Ed. Médica Panamericana. Madrid, 2006, págs. 71-83.
- Cookson BD, Philips I. 1988. Epidemic methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 21 (supl. C): 57-65.
- Cookson BD. 1998. The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. J Antimicrob Chemother. 41(1):11-8.
- Corbella X, Domínguez MA, Pujol M, Ayats J, Sendra M, Pallares R, Ariza J, Gudiol F. 1997. *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for

subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 16: 351-357

- Corso A, Santos Sanches I, Aires de Sousa A, Rossi A, and de Lencastre H. 1998. Spread of a methicillin-resistant and multiresistant epidemic clone of *Staphylococcus aureus* in Argentina. Microb Drug Resist. 4: 277-288
- Cosgove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. 2003. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 36(1):53-59.
- Couto I, et al. 1996. Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates the *Staphylococcus sciuri*. Microb. Drug Resist. 2: 377-391.
- Cox RA, Conquest C, Mallaghan C, and Marples RR. 1995. A major outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* caused by a new phage-type (EMRSA-16). J Hosp Infect. 29: 87-106.
- Crawford SE, and Daum RS. 2005. Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Pediatr Infect Dis J. 24: 459-460.
- Crossley K, Landesman B, Zaske D. 1979. An outbreak of infection caused by a strain of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. II. Epidemiologic studies. J Infect Dis. 139: 280-287.
- Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guina J, Sánchez-Conde M, Sánchez-Somolinos M, Bouza E, and the Spanish Group for the Study of *Staphylococcus*. 2004. Antimicrob Agents Chemoter. 48: 4240-4245.
- Chambers H.F., Hartman B.J. and Tomasz A. 1985. Increased amounts of a novel penicillin-binding proteins in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. J Clin Invest. 76: 325-331.
- Chambers H.F. 1987. Coagulase-negative staphylococci resistant to beta-lactam antibiotics *in vivo* produce penicillin-binding protein 2a. Antimicrob Agents Chemoter. 31: 1919-1924.
- Chambers HF, Archer G, Matsushashi M. 1989. Low level methicillin resistance of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemoter. 33: 424-428.
- Chambers H.F., Sachdeva M.J., Hackbarth C.J. 1994. Kinetics of penicillin binding protein to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus*. Biochem J. 301:139-144.
- Chambers HF. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?. Emerg Infect Dis. 7: 18-24.
- Chang FY, MacDonald BB, Peacock JE Jr, Musher DM, Triplett P, Mylotte JM et al. 2003. A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus*

bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. *Medicine*. 82: 322-332.

- Chang S, et al. 2003. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med*. 348: 1342-1347.
- Charles PG, Ward PB, Jonson PD, et al. 2004. Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 38: 448-451.
- Chaves F, García-Martínez J, De Miguel S, Sanz F, Otero JR. 2005. Epidemiology and clonality of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteremia in a tertiary-care hospital in Spain. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 26: 150-156.
- Chung M, De Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamson I, Aires de Sousa M, et al. 2000. Multilaboratory Project Collaborators. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist*. 6: 189-98.
- Chung M, Dickinson G, de Lencastre H, and Tomasz A. 2004. International clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two hospitals in Miami, Florida. *J Clin Microbiol*. 42: 542-547.
- Da Silva Coimbra MV, Silva-Carvalho MC, Wisplinghoff H, Hall GO, Tallent S, Wallace S, Edmond MB, Figueiredo AMS, and Wenzel RP. 2003. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large geographic area of the United States. *J Hosp Infect*. 53: 103-110.
- Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, Hussain F, Mongkolrattanothai K, Jamklang M, Boyle-Vavra S. 2002. A novel methicillin-resistant cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis*. 186: 1344-347.
- De A Trindade P, Pacheco RL, Costa SF, Rossi F, Barone AA, Mamizuka EM, and Levin AS. 2005. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 43: 3435-3437.
- De Lencastre H., Figueiredo A.M.S., Urban C., Rahal J. and Tomasz A. 1991. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 35: 632-639.
- De Lencastre H., De Jonge B.L.M., Matthews P.R., Tomasz A. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33: 7-24.

- De Lencastre H, Severina EP, Milch H, Thege MK, Tomasz A. 1997. Wide geographic distribution of a unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian hospitals. *Clin Microbiol Infect.* 3: 289-96.
- Denis O, et al. 2002. Molecular epidemiology of resistance to macrolides-lincosamides-streptogramins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) causing bloodstream infections in patients admitted to Belgian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:755-766
- Deplano A, Witte W, van Leeuwen, WJ, Brun, Y. and Struelens MJ. 2000. Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. *Clin. Microbiol. Infect.* 6: 239-245.
- Díaz MD, Sánchez-Carrillo C, Bouza E. 1994. Evolución de la resistencia a antimicrobianos de *S. aureus* aislados en hospitales españoles. *Rev Clin Esp.* 194 (4): 814-820.
- Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, and Beach M. 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 32 (supl 2): S114-132.
- Dietrich DW, Auld DB, Mermel LA. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Southern New England children. 2004. *Pediatrics* 113:e347 e352, (<http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/113/4/e347>).
- Diep BA, Sensabaugh GF, Somboona S, Carleton HA, and Perdreau-Remington F. 2004. Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine Leucocidin. *J Clin Microbiol.* 42: 2080-2084.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* 13: 16-34
- Domínguez MA, de Lancastre H, Liñares J, and Tomasz A. 1994. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in Spanish hospital. *J Clin Microbiol.* 32:2081-2087.
- Domínguez MA, Coll P, Coque T, Vazquez J, Vila J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. En: Cantón R, Cercenado E (Eds). *Procedimientos en Microbiología Clínica SEIMC.* 2005.
- Dos Santos Soares MJ, da Silva-Carvalho MC, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. 2000. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital

and emergence of heterogenous resistance to glycopeptide antibiotics among these isolates. *J Hosp Infect.* 44: 301–308.

- Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 819-24. Epub 2002 Sep 03.
- Embil J, Ramotar K, Tomance L, Alfa M, Conly J, Cronk S, Taylor G, Sutherland B, Louie T, Henderson E, et al. 1994. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in tertiary care institutions on the Canadian prairies 1991-1992. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 15: 646-651.
- Enright MC, Spratt BG. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* 7: 482-487.
- Enright MC, Day NP, Davies CE, et al. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 38:1008-1015.
- Enright MC, Robinson DA, Randle G, et al. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99:7687-92.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). 2003. Annual report EARSS – 2003. Disponible en <http://www.earss.rivm.nl>.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). 2004. Annual report EARSS – 2004. Disponible en <http://www.earss.rivm.nl>.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). 2005. Annual report EARSS – 2004. Disponible en <http://www.earss.rivm.nl>.
- Fang VH, Hsueh PR, Hu JJ. Et al. 2004. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children in northern Taiwan. *J. Microbiol Immunol Infect.* 37: 29-34.
- Faria NA, Oliveira DC, Westh H, Monnet DL, Larsen AR, Skov R, and de Lencastre H. 2005. Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. *J Clin Microbiol.* 43: 1836-1842.
- Fernández C, Gaspar C, Torrellas A, Vindel A, Saez-Nieto JA, Cruzet F, Aguilar L. 1995. A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial to evaluate the safety and efficacy of mupirocin calcium ointment for eliminating nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among hospital personnel. *J Antimicrob Chemother.* 35(3): 399-408.
- Fey PD, Said-Salim B, Rupp ME, Hinrichs SH, Boxrud DJ, Davis CC, Kreiswirth BN, and Schielvert PM. 2003. Comparative molecular analysis of

community- or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 47: 196-203.

Figueiredo AMS, Ha E, Kreiwirth BN, De Lencastre H, Noel GH, Senterfit L, and Tomasz A. 1991. *In vivo* stability of heterogeneous expression classes in clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci. J. Infect. Dis. 164:883-887.

Finlay JE, Miller LA, Poupard JA. 1997. Interpretative criteria for testing susceptibility of staphylococci to mupirocin. Antimicrob Agents Chemother. 41: 1137-1139.

Fleming A. On the antimicrobial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *H. influenzae*. Br J Exp Pathol 1929; 10: 226.

Fluit AC, Wielders CLC, Verhoef J, and Schmitz FJ. 2001. Epidemiology and susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 University Hospitals participating in the European SENTRY study. J Clin Microbiol. 39: 3727-3732.

Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, Johnston P, Sinha G, Ross T, Cai M, Hansel N, Perl T, Ticehurst JR, Carrol K, Thomas DL, Nuermberger E, and Bartlett JG. 2005. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine Leukocidin genes. Clin Infect Dis. 40: 100-107.

Frazer BW, Lynn J, Charlebois ED, Lambert L, Lowery D, Perdreau-Remington F. 2004. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in emergency department skin and soft-tissue infections. Ann Emerg Med. 45: 321-322.

Furuya D, Yagihashi A, Uehara N, Yajima T, Kobayashi D, Watanabe N. 2001. Genotype analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with and without reduced susceptibility to vancomycin using pulsed-field gel electrophoresis. Infect Control Hosp. Epidemiol. 22: 536-538.

Geha DJ, UHL JR, Gustaferra CA, Persing DH. 1994. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant Staphylococci in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 32: 1768-1772.

Geisel R, Schmitz FJ, Thomas L, Berns G, Zetsche O, Ulrich B, Fluit AC, Labischinsky H, Witte W. 1999. Emergence of heterogeneous intermediate vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in the Dusseldorf area. J Antimicrob Chemother. 43: 846-848.

Ghuysen, J.M. 1994. Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. Trends Microbiol. 2: 372-380.

- Gilbart J, Perry CR, and Slocombe B. 1993. High-level mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*: Evidence for two distinct Isoleucyl-tRNA synthetases. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 32-38.
- Goering R. 1993. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 14: 595-600.
- Gomes AR, Sanches IS, Aires de Sousa M, Castaneda E, and de Lencastre H. 2001. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombian hospitals: dominance of a single unique multidrug-resistant clone. *Microb Drug Resist.* 7: 23-32.
- Goossens H, Ferech M, Stichele RV, Elseviers M, for the ESAC Project Group. 2005. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet.* 365: 579-587.
- Groom AV, Wolsey DH, Naimi TS, Smith K, Johnson S, Boxrud D, Moore KA, and Cheek JE. 2001. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. *JAMA.* 286: 1201-1205.
- Gross-Schulman S, Dassey D, Mascola L, and Anaya C. 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *JAMA.* 280: 421-422.
- Guallar C, Ariza J, Domínguez MA, Peña C, Grau I, Verdaguer R, Torrens LI, Gudiol F. 2004. An insidious nosocomial outbreak due to *Salmonella enteritidis*. *J Hosp Infect.* 25:10-16.
- Hanaki H, Labischinski H, Inaba Y, Kondo V, Murakami H, and Miramatsu K. 1998. Increase in glutamine-non-amidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J Antimicrob Chemother.* 42:315-320.
- Hansen A, Kjeldsen G, Ericson Sollid J. 2004. Local variants of staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci: evidence of horizontal gene transfer?. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 285-296
- Hartman A, Tomasz B. 1981. Altered penicillin-binding-proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemother.* 19:726-35.
- Hartman B.J. and Tomasz A. 1984. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 158: 513-516.

- Hayes, M. V., N. A. C. Curtis, A. W. Wyke, and J. B. Ward. 1981. Decreased affinity of a penicillin binding protein for β -lactam antibiotics in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. FEMS Microbiol. Lett. 10:119-122.
- Healy CM, Hulten KG, Palazzi DL, CampbellJR, and Baker CJ. 2004. Emergence of new strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. Clin Infect Dis. 39: 1460-1466.
- Herold BC, Immergluk LC, Maranan MC, et al. 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. JAMA. 279: 593-598.
- Hiramatsu K, et al. 1997. Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother. 40: 135-136.
- Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet. 350: 1670–1673.
- Hiramatsu K. 1998. The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. Am J Med. 104: 7S-10S.
- Hiramatsu K. 2001. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. Lancet Infect Dis. 1: 147-155.
- Hiramatsu K, Longzhu C, Makoto K and Teruyo I. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology 2001; 9. No. 10.
- Hiramatsu K. 2004. Elucidation of the mechanism of antibiotic resistance acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and determination of its whole genome nucleotide sequence. JMAJ. 47: 153-9.
- Howden BP, Ward PB, Charles PG, et al. 2004. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. Clin Infect Dis. 38: 521-528.
- Hubert SK, Mohammed JM, Fridkin SK, Gaynes RP, McGowan JE, Jr., Tenover FC. 1999. Glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*: evaluation of a novel screening method and results of a survey of selected U.S. hospitals. J Clin Microbiol. 37: 3590–3593.
- Imshade J. 1978. Genetic regulation of penicillinase synthesis in gram-positive bacteria. Microbiol Rev. 42: 67-83.

- Ito T, and Hiramatsu K. 1998. Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei Medical Journal*. 39: 525-533.
- Ito T, Katayama Y, and Hiramatsu K. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mecA* of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother*. 43: 1449-1458.
- Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsuminoto K, Tiensasitorn CH, and Hiramatsu K. 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 45: 1323-1336.
- Ito T Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, and Hiramatsu K. 2004. Novel type staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother*. 48: 2637-2651.
- Jarvis WR, Ostrowsky B. 2003. Dinosaurs, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and infection control personnel: survival through translating science into prevention. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 24: 392-396.
- Jernigan J. 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community: infection control strategies (abstract 1463). ICAAC (Washington DC, 2004). Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Jevons MP. "Celbenin"-resistant staphylococci. *Br Med J* 1961; 1: 124-125
- Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gérard A. Del antibiograma a la prescripción. Capítulo: Los antibióticos. Clasificación, espectro y mecanismos de acción. En: Baquero F, Cantón R. Ed: Del antibiograma a la prescripción. Pag.9-22. Éditions Biomérieux. 2ª edición marzo 2004. Francia/T.L.McCann. Santé Lyon. RCS Lyon B 398160242.
- Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gérard A. Del antibiograma a la prescripción. Capítulo: Principales fenotipos de resistencia de las bacterias gram positivas. En: Baquero F, Cantón R. Ed: Del antibiograma a la prescripción. Pag.76-77. Éditions Biomérieux. 2ª edición marzo 2004. Francia/T.L.McCann. Santé Lyon. RCS Lyon B 398160242.
- Johnson AP, Aucken HM, Cavendish S, Ganner M, Wale MC, Warner M, et al. 2001. Dominance of EMRSA-15 and EMRSA-16 MRSA causing nosocomial bacteraemia in the UK: analysis of isolates from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). *J Antimicrob Chemother*. 48: 143-4.

- Jones TF, Kellum ME, Porter SS, Bell M, Schaffner W. 2002. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*. 8: 82-84.
- Juuti K, Ibrahim S, Virolainen-Julkunen A, Vuopio-Varkila J, and Kuusela P. 2005. The *pls* gene found in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is common in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri*. *J Clin Microbiol*. 43: 1415-1419.
- Kalmeijer MD, Coertjens H, Van Nieuwland-Bollen PM, Bogaers-Hofman D, De Baere GAJ, Stuurman A, Van Belkum A, and Kluitmans JAJW. 2002. Surgical site infections in orthopedic surgery: the effect of mupirocin nasal ointment in a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Clin Infect Dis*. 35: 353-358.
- Kaplan SL, Hulten KG, Gonzalez BE, hammarman WA, Lamberth L, Versalovic J, and Mason EO. 2005. Three-year surveillance of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. *Clin Infect Dis*. 40: 1785-1791.
- Karakova SV, Hageman JC, Matava M, Srinivassan A, et al. 2005. A clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among professional football players. *N Engl J Med*. 352: 468-475.
- Katayama *et al.* 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 44:2680-2685.
- Katayama *et al.* 2003. Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 185: 2711-2722.
- Katayama Y, Zhang HZ, Chambers HF. 2004. PBP2a mutations producing very-high-level resistance to beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother*. 48(2): 453-459.
- Khan SA, and Novick RP. 1980. terminal nucleotide sequences of Tn551, a transposon specific erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus*: homology with Tn3. *Plasmid*. 4: 148-154.
- Kim M-N, Hwang SH, Pyo Y-J, Mun H-M, Pai CH. 2002. Clonal Spread of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a university hospital in Korea. *J Clin Microbiol*. 40: 1376–1380.
- Kirby WMN. 1944. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin. *Science*. 99:452-453.

- Kirst HA, Thompson DG, and Nicas TI. 1998. Historical yearly usage of vancomycin. *Antimicrob Agents Chemoter.* 42:1303-1304.
- Kitai S, Shimizu A, Kawano J, Sato E, Nakano CH, Uji T, and Kitagawa H. 2005. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. *J Vet Med sci.* 67: 107-110.
- Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R, and the National Nosocomial Infections Surveillance System. 2006. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin Infect Dis.* 42: 389-391.
- Kluitmans J, Van Belkum A, and Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 10: 505-520.
- Knox R. "Celbenin"-resistant staphylococci. *Br Med J* 1961; 1: 126
- Kreiswirth BN, McGreer NA, Kornblum J, Simon EA, Eisner W, Poon R, Richter J, Campbell I, and Low DE. 1990. The use of variable gene probes to investigate a multihospital outbreak of MRSA, p.521-530. *A: Molecular Biology of the Staphylococci.* Editor: Novick RP. VCH publishers. New York (EEUU).
- Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit W, Eisner W, Maslow J, McGeer A, et al. 1993. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science.* 259: 227-230.
- Krzyszton-Russjan J, Gniadkowski M, Polowniak-Pracka H., Hagemajer E. and Hryniewicz W. 2002. The first *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin in Poland. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 1065-1069.
- Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, and Hiramatsu K. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 357:1225-1240.
- Laupland KB. 2003. Treatment of *Staphylococcus aureus* colonization and prophylaxis for infection with topical intranasal mupirocin: an evidence-based review. *Clin Infect Dis.* 37:933-938.
- Laurent F, Lelièvre H, Cornu M, Vandenesch F, Carret G, Etienne J, and Flandrois JP. 2001. Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals. *J Antim Chemother.* 47: 277-283.

- Leclercq R, and Courvalin P. 1991. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1267–1272.
- Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis.* 34: 482-492.
- Lemaître N, Sougakoff W, Masmoudi A, Fievet MH, Bismuth R, and Jarlier V. 1998. Characterization of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in nosocomial spread. *J Clin Microbiol.* 36: 81-85.
- Leski T, Oliveira D, Trzcinski k, Sanches IS, de Sousa MA, Hryniewicz W, and de lencastre H. 1998. Clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Poland. *J Clin Microbiol.* 36: 3532-3539.
- L'Heriteau F, Lucet JC, Scanvic A, Bouvet E. 1999. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and familial transmission (Letter). *JAMA.* 280:421-422.
- Liassine N, Auckenthaler R, descombes MCH, Bes M, Vandenesch F, and Etienne J. 2004. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Switzerland contains the Panton-Valentine leukocidin or exfoliative toxin genes. *J Clin Microbiol.* 42: 825-828.
- Lim, D. and Strynadka, N.C. 2002. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Struct. Biol.* 9: 870-876.
- Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, and Etienne J. 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 29: 1128-1132.
- Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, vandenesch F, and Etienne J. 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 1062-1066.
- Liñares J. 2001. The VISA/GISA problem: therapeutic implications. *Clin Microbiol Infect.* 7 (supl. 4): 8-15.
- Lowy, F.D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339: 520-532.
- Lowy FD. Infecciones estafilocócicas. En: Harrison, Kasper D, Braunwald E, Fanci A, Hanser S, Longo D, Jameson J (Eds). *Principios de Medicina Interna* (16ª edición). México. Mc Graw-Hill interamericana 2006; 911-921.

- Lyon BR, May JW, and Skurray RA. 1984. Tn4001: a gentamicin and kanamycin resistant transposon in *Staphylococcus aureus*. Mol. Gen. Genet. 193:554-556.
- Ma XX, Ito T, Tiensasitorn CH, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Draum RS, Hiramatsu K. 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother. 46:1147-1152.
- Maguire GP, Arthur AD, Boustead PJ, Dwyer B, and Currie BJ. 1998. Clinical experience and outcomes of community-acquired and nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a northern Australian hospital. J. Hosp. Infect. 38: 273-281.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA. 95: 3140–3145.
- Maier J, melzIH, reischl U, Drubel I, Witte W, Lehn N, Linde H. 2005. Panton-Valentine leukocidin positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in germany associated with travel of foreign family origin. Eur j Microbiol Infect Dis. 24: 637-639.
- Maki H, mcCallum N, Bischoff M, Wada A, Berger-Bachi B. 2004. *tcaA* inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 48: 1953-1959.
- Marchese A, Balistreri G, Tonoli E, Debbia EA, Schito GC. 2000. Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in a large Italian hospital. J Clin Microbiol. 38: 866–869.
- Maslow JN, Ellins Mulligan M, Arbeit R. 1993. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin Infect Dis. 17: 153-164.
- Maslow JN, Mulligan ME. 1996. Epidemiologic typing systems. Infect Control Hosp Epidemiol. 17: 595-604.
- Massidda O, Montanari MP, Mingoia M, and Varaldo PE. 1996. Borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain have more in common that reduced susceptibility to penicillinase-resistant penicillins. Antimicrob Agents Chemother. 40: 2769-2774.
- Mato R, Santos Sanches I, Venditti M, Platt DJ, Brown A, Chung M, and de Lencastre H. 1998. Spread of the multiresistant Iberian clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Italy and Scotland. Microb Drug Resist. 4: 107-112.

- Matsuoka M, Endou K, Kobayashi H, Inoue M, and Nakajima Y. 1998. A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 167: 221-227.
- McDougal LK, Thomsberry C. 1986. The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. J Clin Microbiol. 23: 832-839
- McDougal LK, Steward ChD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, and Tenover FC. 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. J Clin Microbiol. 41: 5113-5120.
- Melter O, Santos Sanches I, Schindler J, Aires de Sousa M, Mato R, Kovarova V, Zemlickova H, and de Lencastre H. 1999. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic. J Clin Microbiol. 37: 2798-2803.
- Melter O, Aires de Sousa M, Urbásková P, Jakubu V, Zemlicková H, and de Lencastre H. 2003. Update on the mayor clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Czech Republic. J Clin Microbiol. 41: 4998-5005.
- Melter O, Aires de Sousa M, Laskafeldova K, Urbaskova P, Wunschova M, and de Lencastre H. 2004. Delineation of the endemic and sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the Czech hospital. Microb Drug Resist. 10: 218-223.
- Mickelsen PA. 1997. The use of molecular strain typing has become a standard of practice. Clin Microbiol Newsletter. 19: 137-142.
- Miklasevics E, Haeggman S, Balode A, Sanchez B, Martinsons A, Olsson-Liljequist B, Dumpis U. 2004. Report on the first PVL-positive community acquired MRSA strain in Latvia. Euro Surveill. 9: 5-6.
- Mongkolrattanothai K, .2003. Severe *Staphylococcus aureus* infections caused by clonally related community-acquired methicillin-susceptible and methicillin-resistant isolates. Clin Infect Dis. 37: 1050-1058.
- Montesinos I, Salido E, Delgado T, Lecuona M, Sierra A. 2003. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a University Hospital in the Canary Islands. Infect Control Hosp Epidemiol. 24: 667-672.
- Moore PC, and Lindsay JA. 2002. Molecular characterisation of the dominant UK methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, EMRSA-15 and EMRSA-16. J Med Microbiol. 51: 516-521.

- Moran GJ, Amii RN, Abrahamian FM, and Talan DA. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired skin infections. *Emerg Infect Dis.* 11: 928-930.
- Morton TM, Johnston JL, Patterson J, and Archer GL. 1995. Characterization of a conjugative staphylococcal mupirocin resistance plasmid. *Antimicrob Agents Chemother.* 39: 1272-1280.
- Mulhaussen PL, Harrel LJ, Weinberger M, Kochersberg GG, feussner JR. 1996. Contrasting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in Veterans affairs and community nursing homes. *Am J Med.* 100: 24-31.
- Mulvey MR, Chui L, Ismail J, Louie L, Murphy C, Chang N, and Alfa M. 2001. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 39: 3481-3485.
- Murchan S, Kaufmann MA, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, Fussing V, Salmenlinna S, Vuorio-Varkila J, El Solh N, Cunny C, Witte W, Tassios PT, Legakis N, van Leeuwen W, VanBelkum A, Vindel A, Laconcha I, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjo U, Combes G, and Cookson B. 2003. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol.* 41: 1574-1585.
- Murphy EL, Huwyler L, Bastos MC. 1985. Transposon Tn554: Complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutants. *EMBO J.* 4:3357-3365.
- Musser J, Kapur V. 1992. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J Clin Microbiol.* 30: 2058-63.
- Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boice JM, et al. 2003. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and enterococcus. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 24:362-386.
- Nadler H, Dowzicky M, Feger C, Pease MR, Prokocimer P. 1999. Quinupristin/Dalfopristin: A novel selective-spectrum antibiotic for the treatment of multi-resistant and other gram-positive pathogens. *Clin Microbiol Newsletter.* 21: 103-112.
- Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, Borehardt SM, Boxrud DJ, Etienne J, et al. 2003. Comparison of community- and health care-associated

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. JAMA. 290: 2976-2984.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved Standards Fifth Edition M7-A5 Vol 17 No2. Wayne, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2004. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fourteenth Informational Supplement M100-S14, vol.24 No.1 Wayne, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Neuhaus FC, Georgopapadaku, N. Strategies in β -lactam design. En: Sutcliffe J, Georgopapadaku, NH (Eds). Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy. Chapman and Hall, New York 1992; 205-273.

Noble WC, Virani Z, and Cree RGA. 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiological Letters. 93: 195-198.

Novick RP, and Murphy E. 1985. MLS-resistance determinants in *Staphylococcus aureus* and their molecular evolution. J Antimicrob Chemother. 16 (suppl.A): 101-110.

Ogston A. 1883. Micrococcus poisoning. J Anat Physiol. 17: 24-58.

Ojo KK, Striplin MJ, Ulep CC, Close NS, Zittle J, Luis H, Bernardo M, LEitao J, Roberts MC. 2006. Staphylococcus efflux msrA gene characterized in Straptococcus, Enterococcus, Corynebacterium and Pseudomonas isolates. Antimicrob Agents Chemother 50:1089-1091

Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M, Tiensasitorn Ch, Ito T, and Hiramatsu K. 2002. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. J Clin Microbiology. 40: 4289-4294.

Oliveira D, Santos-Sanches I, Mato R, Tamayo M, Ribeiro G, Costa D, and de Lancastre H. 1998. Virtually all methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the largest Portuguese teaching hospital are caused by two internationally spread multiresistant strains: the 'Iberian' and the 'Brazilian' clones of MRSA. Clin. Microbiol. Infect. 4: 373-384.

Oliveira DC, Tomasz A, and De Lancastre H. 2001. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. Microb Drug Resist. 7: 349-361.

- Oliveira D, Alexander T, de Lancastre H. 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis*. 2: 180-189.
- Oliveira DC, and de Lancastre H. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 46: 2155-2161.
- Oteo J, Cruchaga S, Campos J, Sáez JA, Baquero F y miembros el Grupo del European Antimicrobial Resistance Surveillance System. 2002. Resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* aislados de sangre en 31 hospitales españoles de la Red Europea de Vigilancia de Resistencia a Antibióticos (2000). *Med Clin (Barc)*. 119: 361-365.
- Oteo J, Baquero F, Vindel A, and Campos J on behalf of the Spanish members of The European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). 2004. Antibiotic resistance in 3113 blood isolates of *Staphylococcus aureus* in 40 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2000-2004). *J Antimicrob Chemother*. 53: 1033-1038.
- Pan ES, Diep BA, Charlebois ED, Auerswald C, Carleton HA, Sensabaugh GF, and Perdreau-Remington F. 2005. Population dynamics of nasal strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – and their relation to community-associated disease activity. *J Infect Dis*. 192: 811-818.
- Panlilio AL, et al. 1992. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 13: 582-586.
- Panton PN, Valentine FCO. 1932. Stafilococcal toxin. *Lancet*. 222: 506-508.
- Parker MT, Hewitt JH. 1970. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 1: 800-804.
- Pascual A, Palomino J, Perea EJ. Infecciones estafilocócicas. En: Farreras-Rozman, Ausina V, Callejas JM, Carmena R, Carreras A, *et al.* (Eds). *Medicina Interna*. Vol II. (15ª edición). Madrid. Elsevier 2005; 2235-2241.
- Pattee PA, Lee CH, and Bannantine JP. 1990. Genetical and physical mapping of the chromosome of *Staphylococcus aureus*. P. 41-48. A: *Molecular Biology of the Staphylococci*. Editor: Novick RP. VCH publishers. New York (EEUU).
- Paulse IT, Firth N, Skurray RA. 1997. Resistance to antimicrobial agents other than β -lactams. En: Crossley KB, Archer GL, eds. *The Staphylococci in human disease*. P. 158-174. Nueva York Churchill Livingstone.

- Peña C, Fernández-Sabé N, Domínguez MA, Pujol M, Martínez-Castelao A, Ajats J, Gudiol F, Ariza J. 2004. *Staphylococcus aureus* nasal carriage in patients on haemodialysis: role of cutaneous colonization. J Hosp Infect. 58: 20-27.
- Pérez-Roth E, Lorenzo-Díaz F, and Méndez-Álvarez S. 2003. Establishment and clonal dissemination of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* UK-16 epidemic strain in a Spanish hospital. J Clin Microbiol. 41: 5353.
- Pérez-Roth E, Lorenzo-Díaz F, Batista N, Moreno A, Méndez S. 2004. Tracking Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones during a 5-Year Period (1998 to 2002) in a Spanish Hospital. J Clin Microbiol 42: 4649-4656.
- Perichon B, Courvalin P. 2004. Heterologous expression of the enterococcal vanA operon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 48:4281–4285.
- Pérez Trallero E, García Arenzana JM, Ansa Castañeda A, Paisan Grisolia L. 1981. Unusual multiresistant *Staphylococcus aureus* in a newborn nursery. Am J Dis Child. 135: 689-692.
- Pérez Trallero E, García Arenzana JM, Cilla Eguliz G, Cisterna Cancer R. 1988. Prevalence of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospital. Rev Infect Dis. 10: 627-628.
- Perichon B, Courvalin P. 2004. Heterologous expression of the enterococcal vanA operon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 48:4281–4285.
- Perl TM, Cullen JJ, Wenzel RP, Zimmerman MB, Pfaller MA, Sheppard D, Twombly J, French PP, Herwarldt LA, and the Mupirocin and the Risk of *Staphylococcus aureus* in fections. N Engl J Med. 346: 1871-1877.
- Picazo JJ, Betriu C, Rodríguez-Avial I, Culebras E, Gómez M y Grupo VIRA. 2004. Vigilancia de resistencias a los antimicrobianos: estudio VIRA 2004. Enferm Infecc Microbiol Clin. 22:517-525.
- Pigrau C. 2003. Oxazolidinonas y glucopéptidos. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 21:157-64.
- Prevost G, Cribier B, Couppié P, Petian P, Supersac G, Finck-Barbancon V, et al. 1995. Panton-Valentine leucocidin and gamma-haemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. Infect Immun. 63:4121–9.

- Projan SJ. 2000. Antibiotic resistance in staphylococci. En: Fischett VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Roods JL, eds. Gram-positive pathogens. P. 463-470. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Pujol M, Peña C, Pallarés R, Ayats J, Ariza J, Gudiol F. 1994. Risk factors for nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 13: 96-102.
- Pujol M, Peña C, Pallarés R, et al. 1996. Nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. Am J Med. 100(5): 509-516.
- Reverdy ME, Jarraud S, Bobin-Dubreux S, Burel E, Girardo P, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. 2001. Incidence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in two French hospitals. Clin Microbiol Infect. 7: 267-272.
- Reynolds E, Ross JI, Cove JH. 2003. *Msr(A)* and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters?. I. J. Antimicrob Agents. 22: 228-236.
- Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó I, Ferreira FA, Soares Santos RN, Teixeira B, and Figueiredo AM. 2005. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. J Clin Microbiol. 43: 1985-1988.
- Rings Terry RF, and Lang S. 1998. Ethnicity and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South Auckland. N Z Med J. 24: 151.
- Robert J, Etienne J, Bertrand X on behalf of ONEBRA (Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques). 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Pantone-Valentine Leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000-2003. Clin Microbiol Infect. 11: 585-587.
- Roberts RB, Tennenberg AM, Eisner W, Hargrave J, Drusin LM, Yurt R, and Kreiswirth BN. 1998. Outbreak in a New York city teaching hospital burn center caused by the Iberian epidemic clone of MRSA. Microb Drug Resist. 4: 175-183.
- Roberts RB, de Lencastre A, Eisner W, Severina EP, Shopsin B., Kreiswirth BN, and Tomasz A. 1998. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. MRSA Collaborative Study Group. J. Infect. Dis. 178: 164-171.
- Roberts RB, Chung M, de Lencastre H, Hargrave J, Tomasz A, Nicolau DP, John JF, and Korzeniowski O. 2000. Distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones among health care facilities in Connecticut, New Jersey, and Pennsylvania. Microb Drug Resist. 6: 245-251.

- Rodríguez-Baño J, Millán AB, Domínguez MA, Almirante B, Cercenado E, Padilla B, Pujol M y GEIH/GEMARA/REIPI. 2006. Medidas de control de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. Encuesta del proyecto SARM 2003 GEIH/GEMARA/REIPI. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 24:149-156.
- Rodríguez Creixems M. 1992. Evolución de la resistencia a antimicrobianos de *Staphylococcus* aislados en hospitales españoles. *Enf Infecc Microbiol Clin*. 10 (3): 24-30.
- Romero-Vivas J, Rubio M, Fernández C, Picazo JJ. 1995. Mortality associated with nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 21(6): 1417-1423.
- Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S, and Wootton JC. 1990. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of ATP-binding transport super-gene family. *Mol. Microbiol*. 4:1207–1214.
- Rouch DA, Messerotti LJ, Loo LS, Jackson CA, Skurray RA. 1989. Trimethoprim resistance transposon Tn4003 from *Staphylococcus aureus* encodes genes for a dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase flanked by three copies of IS257. *Mol Microbiol*. 3(2):161-75.
- Rowland SJ, Dyke KGH. 1989. Characterization of the staphylococcal β -lactamase transposon Tn552. *EMBO J*. 8:2761-2773.
- Rudrick JT. 2005. Michigan Department of Community Health. http://www.michigan.gov/documents/VRSA_feb05_HAN_118391_7.pdf
- Ryffel C, Strässle A, Kayser FH, Berger-Bächi B. 1994. Mechanisms of heteroresistance in methicillin *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 38: 724-728.
- Sábada B, Azanza JR. Antibióticos macrólidos y otros antibióticos. En: Velásquez; Lorenzo P, Moreno A, Leza JC, Lizasoain I, Moro MA (Eds). *Farmacología básica y clínica*, 17ª edic. Ed. Médica Panamericana. 2004. Buenos aires; Madrid. Pag 825-839.
- Sabath LD, Wheeler N, Laverdiere M, Blazevic D, Wilkinson BJ. 1977. A new type of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 1: 433.
- Saïd-Salim B, Mathema B, braughton K, Davis S, Sinsimer D, Eisner W, Likhoshvay Y, DeLeo FR, and Kreiswirth N. 2005. Differential distribution and expression of Panton-Valentine Leucocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 43: 3373-3379.
- Saiman LO, O'Keefe M, Graham PL et al. 2003. Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women. *Clin Infect Dis*. 37: 1313–1319.

- Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC, Wennersten C, Venkataraman L, Novick RP, Gold HS. 2002. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 1492-1502.
- Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC, Novick RP, Schwaber MJ, Gold HS. 2003. *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) group II: is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance?. *J Infect Dis.* 187: 929-938.
- Sa –Leao R, Santos Sanches I, Días D, Peres I, Barros MR, De Lencastre H. 1999. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain?. *J Clin Microbiol.* 37: 1913-1920.
- Salgado C, Farr B, Calfee D. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis.* 36: 131-139.
- Salmenlinna S, Lyytikäinen O, and Vuopio-Varkila J. 2002. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Finland. *Emerg Infect Dis.* 8: 602-607.
- Sanches IS, Ramírez M, Troni H, Abecassis M, Padua M, Tomasz A, et al. 1995. Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain. *J Clin Microbiol.* 33:1243-1246.
- Sanford MD, Widmer AF, Bale MJ, Jones RN, Wenzel RP. 1994. Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 19: 1123-1128.
- San Román L, Martín ML, Morán A. Antibióticos IV: tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol, otros antibióticos. En: Velasco A, San Román L, Serrano J, Martínez-Serra R, Cadaviz I (Eds). *Farmacología fundamental*. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 2003. Madrid, España. Pag 801-820.
- Saravolat LD, Pohlod DJ, Arking LM. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a new source for nosocomial outbreaks. *Ann Intern Med.* 97: 325-329.
- Schaeffler S. 1989. Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* resistant to quinolones. *J Clin Microbiol.* 27: 335-336.
- Schito CG. 2006. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* *Clin Microbiol Infect.* 12 (suppl. 1): 3-8.
- Schmitz FJ, Lindenlauf E, Hofmann B, Fluit AD, Verhoef J, Heinz HP, and Jones ME. 1998. The prevalence of low-and high-level mupirocin

- resistance in staphylococci from 19 European hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 42: 489-495.
- Schwalbe RS, Stapleton JT, and Gilligan PH. 1987. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N Engl J Med.* 316: 927-931.
- Schwartz DC, and Cantor CR. 1984. Separation of yeast chromosome sized DNAs by Pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37: 67-75.
- Severin A, Wu SW, Tabei K, Tomasz A. 2005. High-level (beta)-lactam resistance and cell wall synthesis catalyzed by the *mecA* homologue of *Staphylococcus sciuri* introduced into *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 187(19): 6651-6658.
- Shanson DC. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. 1981. *J Hosp Infect.* 2:11-36.
- Sheagren JN. Overview of staphylococcal infections. In: Van Furth R, Michel ME, Thompson J, ed. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal diseases. Leiden: Boerhaare, 1987.
- Shore A, Rossney AS, Keane CT, Enright MC, and Coleman DC. 2005. Seven novel variants of the staphylococcal cassette chromosome *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:2070-2083.
- Shukla SK, Stemper ME, Ramaswamy SV, Conradt JM, Reich R, Graviss EA, and Reed KD. 2004. Molecular characteristics of nosocomial and native American community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from rural Wisconsin. *J Clin Microbiol.* 42: 3752-3757.
- Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW, and Tomasz A. 1999. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N Eng J Med.* 340: 517-523.
- Sieradzki K, Tomasz A. 2003. Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 185: 7103-7110.
- Sierra-Madero JG, Knapp C, Karaffa C, Washington JA. 1988. Role of β -lactamase and different testing conditions in oxacillin-bordeline-susceptible staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 32: 1754-1757.
- Simor AE, Ofner-Agostini M, Bryce E, McGeer A, Paton S and Mulvey MR. 2002. Laboratory characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals: results of 5 years of National Surveillance, 1995-1999. *J Infect Dis.* 186: 652-660.

- Skurray RA, Firth N. 1997. Molecular evolution of multiply antibiotic resistant staphylococci. P. 167-191. A: Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread. Editor: Wiley J. Ciba Foundation Symposium 207.
- Smith TL, et al. 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. N Engl J Med. 340: 493-501.
- Soll DR, Lockhart SR, Pujol C. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds). Manual of clinical microbiology. (8^a edición) Washington, DC. American Society for Microbiology 2003; 139-161.
- Sopena N, García-Nuñez M, Prats R, Pedro-Bonet ML, Elía S, Nieto J and Sabriá M. 2001. Appearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) sensitive to gentamicin in a hospital with a previous endemic distinct MRSA. Eur J Epidemiology. 17: 317-321.
- Stacey AR, Endersby KE, Chan PC, and Marples RR. 1998. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rugby football team. Br J Sports med. 32: 153-154.
- Stewart GT, Holt RJ. Evolution of natural resistance to the newer penicillin. BMJ 1963; 1:308-11.
- Stranden AM, Roos M, Berger-Bächi B. 1996. Glutamine synthetase and heteroresistance in methicillin resistant in *Staphylococcus aureus*. Microb Drug Resist. 2:201-207.
- Struelens MJ, Deplano A, Godard C, Maes N, and Serruys E. 1992. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol. 30: 2599-2605.
- Suggs AH, Maranan MC, Boyle-Vavra A, and Daum RS. 1999. Methicillin-resistant and borderline methicillin-resistant asymptomatic *Staphylococcus aureus* colonization in children without identifiable risk factors. Pediatr Infect Dis J. 18: 410-414.
- Teixeira LA, Resende CA, Ormonde LR, Rosenbaum R, Figueiredo AM, de Lencastre H, and Tomasz A. 1995. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. J. Clin. Microbiol. 33: 2400-2404.
- Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, and et al. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 32: 407-415.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, and Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction

- patterns produced by pulsed-field electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33: 2233-2239.
- Tenover et al. 2004. Characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* from Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 275-280.
- Thompson RL, Cabezudo I, Wenzel RP. 1982. Epidemiology of nosocomial infections cause by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med.* 97:309-317.
- Tiemersma EW, Bronzwaer LAM, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundmann H, and European Antimicrobial Resistance Surveillance System participants. 2004. Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerg Infect Dis.* 10: 1627-1634.
- Tomasz A, Drugeon HB, De Lencastre HM, Jabes D, McDougal L, Bille J. 1989. New mechanisms for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother.* 33: 1869-1874.
- Turnidge JD, Bell JM. 2000. Methicillin-resistant *Staphylococcal aureus* evolution in Australia over 35 years. *Microb Drug Resist.* 6: 223-229.
- Ubukata k., Yamahita N. and Konno M. 1985. Ocurrence of a beta-lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 34: 170-172.
- Udo EE, Pearman JW, and Grubb WB. 1993. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect.* 25: 97-108.
- Van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann E, and et al. 1998. assessment of resolution and intercenter reproductibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of macrorestriction fragments: a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 36: 1653-1659.
- Van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics and microbial epidemiology. *Cin Microbiol Rev.* 14:547-560.
- Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, and Etienne J. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine Leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis.* 9: 978-984.

- Van Duijkeren E, Wolfhagen MJ, Box AT, Heck ME, Wannet WJ, Fluit AC. 2004. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*. 10: 2235-2237.
- Van Griethuysen A, Van 't Veen A, Buiting A, Walsh T, Kluytmans J. 2003. High percentage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to glycopeptides in The Netherlands. *J Clin Microbiol*. 41: 2487–2491
- Vásquez JE, Walker ES, Franzus BW, Overbay BK, Reagan DR, and Sarubbi FA. 2000. The epidemiology of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Veterans' Affairs Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 21: 459-464.
- Velázquez-Meza ME, Aires de Sousa M, Echaniz-Avilés G, Solórzano-Santos F, Miranda-Novales G, Silva-Sanchez J, and de Lencastre H. 2004. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico city during a 7-year period (1997 to 2003): Clonal evolution and impact of infection control. *J Clin Microbiol*. 42: 3877-3880.
- Vindel A, Sáez-Nieto JA. 1992. Caracterización de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina causantes de brotes mediante tipificación. *Enf Infecc Microbiol Clin*. 10 (3): 36-39.
- Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz C, Rosdahl VT, Braveny I. 1994. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis*. 13 (1): 50-55.
- Walsh TR, and Howe RA. 2002. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev Microbiol*. 56: 657-675.
- Wannet WJB, Heck MEOC, Pluister GN, Spalburg E, van Santen MG, Huijsdens XW, Tiemersma E, de Neeling AJ. 2004. Panton-Valentine leukocidin positive MRSA in 2003: the Dutch situation. *Euro Surveill*. 9: 3-4.
- Welsh J, McClelland J. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*. 8:7213-7218.
- Wenzel RP, Reagan DR, Bertino JS, Baron EJ, Arias K. 1998. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak: a consensus panel's definition and guidelines. *Am J Infect Control*. 26: 102-110.
- Wertheim HF, Vos MC, Ott A, et al. 2004. Mupirocin prophylaxis against nosocomial *Staphylococcus aureus* infections in nonsurgical patients: a randomized study. *Ann Intern Med*. 140: 419-425.
- Westh H, Jarlov JO, Kjersem H, Rosdahl VT. 1992. The disappearance of multiresistant *Staphylococcus aureus* in Denmark: changes in strains of the 83 A complex between 1969 and 1989. *Clin Infect Dis*. 14: 213-222.

- Wielders CL, Vriens MR, Brisse S, De Graaf-Miltenburg LA, Troelstra A, Fleer A, Schmitz FJ, Verhoef J and Fluit AC. 2001. In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 357: 1674-1675.
- Wielders CLC, Fluit AC, Brisse S, Verhoef J, and Schmitz FJ. 2002. *mecA* Gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. *J Clin Microbiol*. 40: 3970-75
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. 18: 6531-6535.
- Witte W, Kresken M, Braulke C, and Cuny C. 1997. Increasing incidence and widespread dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in Central Europe, with special reference to German hospitals. *Clin Microbiol Infect*. 3: 414-422.
- Witte W. 1999. Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *J Antimicrob Chemother*. 44 (suppl. A): 1-9.
- Chen FJ, Lauderdale TL, Huang IW, Lo HJ, Lai JF, Wang HY, Shiau YR, Chen PCh, Ito T, and Hiramatsu K. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. *Emerg Infect Disease*. 11: 1760-1763.
- Witte W, Cuny C, Strommenger B, Braulke C, Heuck D. 2004. Emergence of a new community-acquired MRSA strain in Germany. *Euro Surveill*. 9: 16-18.
- Witte W, Braulke C, Cuny C, Strommenger B, Werner G, heuck D, Jappe U, Wendt C, Linde HJ, Harmsen D. 2005. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine Leukocidin genes in central Europe. *Eur j Microbiol Infect Dis*. 24: 1-5.
- Wong SS, Ho PL, Woo PC, Yuen KY. 1999. Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance. *Clin Infect Dis*. 29: 760–767.
- Wu S, Piscitelli C, De Lencastre H, Tomasz A. 1996. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: Cloning and sequencing of a homologue *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microbial Drug Resistance*. 2: 435-441.
- Yao JDC, and Moellering RC. 1999. Antimicrobial agents, p.1474-1504. En P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane signalling pathway and resistance to β -lactams in staphylococci. *Science* 2001; 291:1962-5.

Zinderman CE. 2004. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among military recruits. *Emerg Infect Dis.* 10:941-944.